

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# Ανάπτυξη μεθοδολογίας φαρμακογονιδιωματικής ανάλυσης σε φορητό εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας (2MoBiL)

Γεώργιος Ψάριος<sup>1\*</sup>, Ευανθία Ηλιοπούλου<sup>1\*</sup>, Ιωάννης Δαραμούσκας<sup>2</sup>, Ιωάννης Λιόπετας<sup>1</sup>,  
Άννα Τσιρώνη<sup>1</sup>, Δημήτριος Σπανός<sup>1</sup>, Αθηνά Τσικρικά<sup>1</sup>, Κωνσταντίνος Καλαφάτης<sup>1</sup>,  
Δήμητρα Ταρούση<sup>1</sup>, Γεώργιος Βαρίτης<sup>1</sup>, Μαρία Κορομηνά<sup>1</sup>, Βασίλειος Κωστόπουλος<sup>2</sup>,  
Σταυρούλα Σιαμόγλου<sup>1\*</sup>, Γεώργιος Π. Πατρινός<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και  
Εξατομικευμένης Θεραπείας,

<sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Πολυτεχνική, Τμήμα Μηχανολόγων και Αεροναυπηγών Μηχανικών, Εργαστήριο Τεχνι-  
κής Μηχανικής και Ταλαντώσεων

\*Συγγραφείς ισότιμης συνεισφοράς

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φαρμακογονιδιωματική τείνει να αποτελέσει ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης υγειονομικής περίθαλψης. Η ευρεία εφαρμογή της βασίζεται στην αναγκαιότητα διεξαγωγής φαρμακογονιδιωματικών αναλύσεων σε οποιοδήποτε κλινικό περιβάλλον, συμπεριλαμβάνοντας τις απομακρυσμένες από αστικά κέντρα περιοχές με περιορισμένο προϋπολογισμό και υλικοτεχνικό εξοπλισμό. Σε αυτή την μελέτη, παρουσιάζεται η ανάπτυξη και η εφαρμογή μιας γρήγορης και αξιόπιστης φαρμακογονιδιωματικής ανάλυσης με την χρήση ενός φορητού εργαστηρίου μοριακής βιολογίας (2MoBiL). Συγκεκριμένα παρουσιάζεται πώς η γονοτύπηση του φαρμακογονιδιωματικού βιοδείκτη *SLCO1B1*<sup>\*5</sup>, μπορεί να διεκπεραιωθεί αξιόπιστα και

αποτελεσματικά με την χρήση φορητού εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας ως μέσο σύγκρισης τη συμβατική επιτραπέζια οργανολογία και μια πρότυπη μέθοδο (KASP assay). Λαμβάνοντας υπόψη το μικρό μέγεθος του φορητού εργαστηρίου, το οποίο του προσδίδει φορητότητα, καθώς και την υψηλή ακρίβεια ανάλυσης που προσφέρει, συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος γονοτύπησης που βασίζεται στο 2MoBiL είναι αξιόπιστη για περαιτέρω μελέτες και κλινική εφαρμογή σε απομακρυσμένες περιοχές και με περιορισμένους πόρους. Ως εκ τούτου, η ταχεία γονοτυπική ανάλυση με 2MoBiL μπορεί να αποτελέσει βασικό πυλώνα για την ευρεία εφαρμογή της φαρμακογονιδιωματικής και της εξατομικευμένης θεραπείας στην κλινική πράξη.

**ΛΕΞΕΙΣ ΕΥΡΕΤΗΡΙΟΥ:** φαρμακογονιδιωματική, γονοτύπηση, *SLCO1B1*, φορητό εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, 2MoBiL

\* Αντεπιστέλλων Συγγραφέας

Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Πανεπιστημιούπολη, Ρίο, 265 04, Πάτρα. Τηλέφωνο: 2610-962339, Email: stavroula.siamoglou@gmail.com

## Εισαγωγή

Ο τομέας της φαρμακογονιδιωματικής στοχεύει στον προσδιορισμό των ποσοστών ανταπόκρισης των φαρμάκων καθώς και της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών (ADRs), λόγω των διαφορών στα γενετικά προφίλ των ασθενών [1], ο οποίος στη συνέχεια μπορεί να υποβοηθήσει την βελτιστοποίηση της χορήγησης των φαρμάκων. Η εφαρμογή της φαρμακογονιδιωματικής στην κλινική πράξη θεωρείται ο ακρογωνιαίος λίθος της εξατομικευμένης ιατρικής εισάγοντας τις γονιδιωματικές εξετάσεις στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Μέχρι σήμερα, οι γενετικές εξετάσεις χρησιμοποιούνται κυρίως για τη διάγνωση ορισμένων, κυρίως μονογονιδιακών ασθενειών, όπως η νόσος Huntington, οι θαλασσαιμίες και η κυστική ίνωση. Παρόλα αυτά, στην μετα-γονιδιωματική εποχή, πολλοί πάροχοι υγειονομικής περίθαλψης άρχισαν να χρησιμοποιούν φαρμακογονιδιωματικές εξετάσεις με σκοπό την παροχή οδηγιών για την προσαρμογή της δόσης φαρμάκων με βάση τη γονιδιωματική κατατομή των ασθενών για περισσότερα από 150 φάρμακα και 750 φύλλα οδηγιών στην βάση δεδομένων Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB; [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)) [2], ενώ παρόμοιες πολιτικές εφαρμόζονται τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) όσο και στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) [3].

Οι στατίνες, το πιο κοινά συνταγογραφούμενο φάρμακο για την υπερχοληστερολαιμία, συγκαταλέγεται μεταξύ των φαρμάκων που συνοδεύονται από καθοδήγηση για τη συνταγογράφηση τους με βάση το γενετικό προφίλ του ασθενούς, καθώς πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση σιμβαστατίνης σε ασθενείς που φέρουν τον φαρμακογονιδιωματικό βιοδείκτη *SLCO1B1*\*5, ενώ αναφέρεται ότι σε χαμηλότερο βαθμό επηρεάζεται και ο μεταβολισμός της ροσουβαστατίνης και της φλουβαστατίνης, από τον ίδιο πολυμορφισμό rs4149056 [4-7].

Σύμφωνα με μια μελέτη συσχέτισης στο ανθρώπινο γονιδίωμα (GWAS), ο φαρμακογονιδιωματικός βιοδείκτης *SLCO1B1*\*5 συσχετίστηκε θετικά με την πιθανότητα μυοπάθειας όσον αφορά το παραλλαγμένο αλληλόμορφο C στο οποίο αντιστοιχεί. Οι συχνότητες των πολυμορφισμών στο γονίδιο *SLCO1B1* δείχνουν μια σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών παγκοσμίως, υποδεικνύοντας την ανάγκη φαρμακογονιδιωματικής ανάλυσης για τον πολυμορφισμό rs4149056 C/T, διότι το ατομικό γονιδιωματικό προφίλ εξαρτάται σημαντικά από τη γενετική ποικιλότητα του πληθυσμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κανένας

άλλος πολυμορφισμός δεν έχει συσχετιστεί με μυοπάθεια που προκαλείται από τη χορήγηση στατινών, η οποία είναι μία από τις κύριες παρενέργειες της θεραπευτικής τους χρήσης [8].

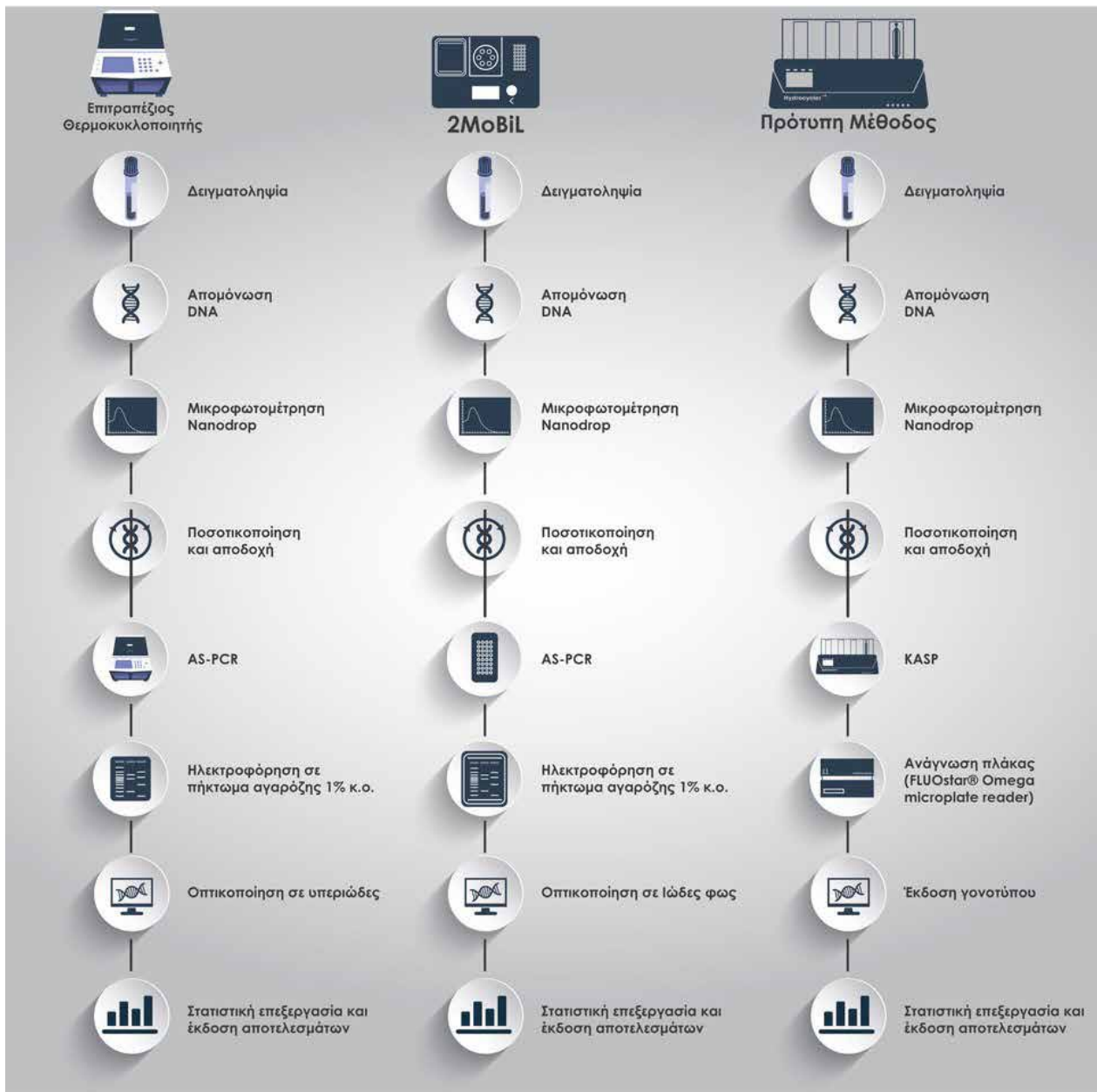
Στη παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs4149056 (T>C) στο γονίδιο *SLCO1B1* (c.T521C, p.V174A) στο εξώνιο 5 του χρωμοσώματος 12 που οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση στατίνης στην κυκλοφορία [9,10]. Η συχνότητα των αλληλόμορφων C που βρέθηκε στον πληθυσμό των Καυκάσιων είναι 0,146 και στον ευρωπαϊκό πληθυσμό 0,161. Επομένως, το rs4149056 είναι μια γενετική παραλλαγή που εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα μεταξύ των πληθυσμών παγκοσμίως. Επιπλέον, οι συχνότητες T / T, T / C και C / C στους Ευρωπαίους είναι 0,698, 0,282 και 0,020, αντίστοιχα [11].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σε αυτή τη μελέτη, εξετάστηκε η σκοπιμότητα χρήσης ενός πλήρως εξοπλισμένου φορητού εργαστηρίου μοριακής βιολογίας (το οποίο αναφέρεται ως μέθοδος «2MoBiL») για τη γρήγορη ανάλυση του πολυμορφισμού rs4149056, που έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για εκπαιδευτικούς σκοπούς σε μαθητές δευτεροβάθμιας αλλά και τριτοβάθμιας εκπαίδευσης σε όλη την Ελλάδα και το εξωτερικό [12].

Οι εξελίξεις στην επιστήμη των υπολογιστών και στη μηχανική εκμάθηση δημιουργούν μια νέα εποχή για μια ποικιλία επιστημονικών τομέων. Οι αλγόριθμοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιούνται στην αναγνώριση προτύπων, στην ανίχνευση αντικειμένων και σε διάφορους τομείς έρευνας. Η διαθεσιμότητα μεγάλου όγκου πληροφοριών ενθαρρύνει την υποκατάσταση των ευρετικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι τώρα από τις τεχνικές μηχανικής εκμάθησης. Συνδυάζοντας μια δεδομένη γνώση μέσω ενός συνόλου δεδομένων με την υπολογιστική αποτελεσματικότητα των σύγχρονων υπολογιστών, είναι δυνατό να δημιουργηθεί ένα σύστημα ικανό να μάθει και να καταλήξει σε συμπεράσματα, καθώς και σε μια ανθρώπινη πράξη. Τέτοια συστήματα αρχίζουν να ενσωματώνονται στο περιβάλλον υγειονομικής περίθαλψης και στην αντίστοιχη έρευνα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μπορούν να κάνουν ακριβείς προβλέψεις χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές δεδομένων που ξεπερνούν τον άνθρωπο όσον αφορά την αξιοπιστία και την ταχύτητα.

## Υλικά και Μέθοδοι

**Για την παρούσα μελέτη**, συγκεντρώθηκαν 81 εθελοντές στα πλαίσια προοπτικής κλινικής μελέτης (NCT03093818). Γραπτή συναίνεση δόθηκε από όλους

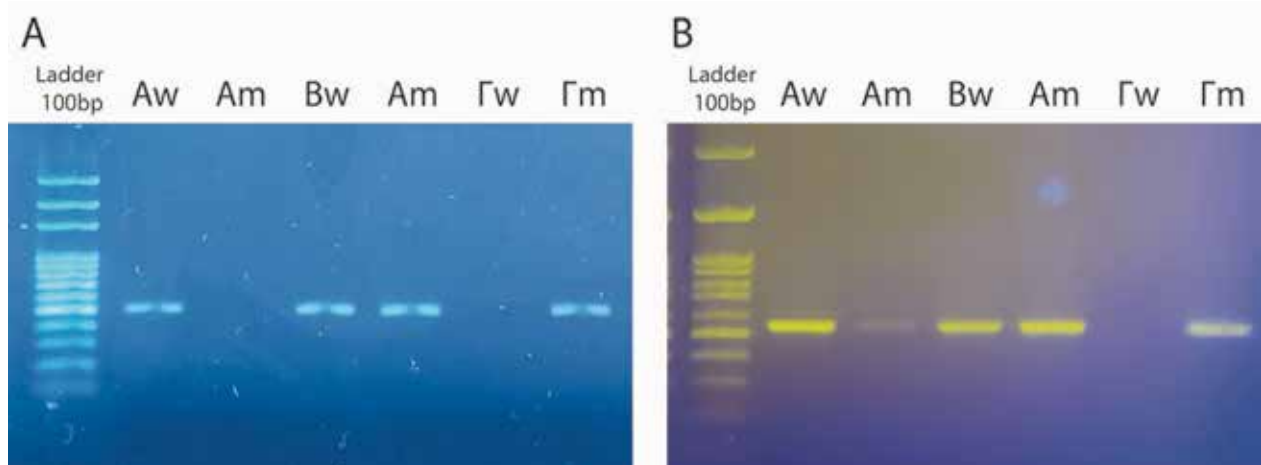


**Εικόνα 1:** Σχεδιάγραμμα της μεθοδολογίας που συνοψίζει τις διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά την χρήση Α) της AS-PCR σε συμβατική επιτραπέζια οργανολογία, Β) της AS-PCR σε 2MoBiL και Γ) της πρότυπης μεθόδου KASP. (2MoBiL: Mobile Molecular Biology Laboratory; PCR, polymerase chain reaction).

τους συμμετέχοντες ασθενείς και η μελέτη έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

DNA απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel). Όλα τα δείγματα γονοτυπήθηκαν με KASP ως πρότυπη μέθοδο, χρησιμοποιώντας τον θερμοκυκλοποιητή Hydrocycler<sup>4</sup> (LGC Genomics) σε συνδυασμό με το σύστημα ανάγνωσης FLUOstar Omega SNP

(BMG LABTECH). Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο φθορολιγονουκλεοτίδια με μία 3' ειδική αλληλουχία εκκινητή και μία 5' περιοχή με δομή φουρκέτας (hairpin region) που φέρει σήμανση με μια από τις δύο φθοροχρωστικές. Η παρουσία της 3' αλληλουχίας εκκινητή επιτρέπει σε αυτά τα φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια να λειτουργούν μαζί με ειδικούς για την περιοχή που μελετάται μη σημασμένους εκκινητές. Οι αλληλουχίες και οι συνθήκες ενίσχυσης είναι διαθέσιμες κατόπιν αιτήματος



**Εικόνα 2:** Παρουσίαση των γονότυπων για τρία (3) διαφορετικά δείγματα DNA (A, B, Γ) χρησιμοποιώντας: (A) AS-PCR σε συμβατική επιτραπέζια οργανολογία και (B) AS-PCR σε 2MoBiL. Για κάθε δείγμα DNA αντιστοιχούν 2 φρεάτια: ένα για το αλληλόμορφο αναφοράς και ένα για το μεταλλαγμένο. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100 bp (Nippon Genetics) και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης είναι 535 bp.

(<https://www.bmglabtech.com>).

Η ενίσχυση του πολυμορφικού τμήματος στον επιτραπέζιο θερμοκυκλοποιητή και στο 2MoBiL διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας την πολυμεράση FirePol Taq (Solis Biodyne) με θερμικό πρωτόκολλο προθέρμανσης στους 95°C για 5min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (αποδιάταξη στους 95°C για 30s, υβριδοποίηση στους 65°C για 50s και επιμήκυνσης στους 72°C για 120s), και από ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 10 λεπτά. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε επιτραπέζιο λουτρό και στο ενσωματωμένο λουτρό του 2MoBiL. Οι γονότυποι διακρίνονται ελέγχοντας τα μεγέθη των ζωνών σε σχέση με τον μάρτυρα μοριακών μεγεθών βήματος 100bp (Nippon Genetics) και κατ'εφαρμογήν της αρχής της αλληλοειδικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (AS-PCR) με δύο εναλλακτικούς αριστερούς εκκινητές που υβριδοποιούνται ειδικά είτε στο T είτε για στο C αλληλόμορφο, υπό υπεριώδη καταύγαση σε επιτραπέζια συσκευή (Ultra-Violet Products) και υπό ιώδη καταύγαση στο 2MoBiL.

### Στατιστική ανάλυση

Προκειμένου να επαληθευθούν τα πειράματα, πραγματοποιήθηκε μια σύγκριση των αποτελεσμάτων από το φορητό εργαστήριο (2MoBiL) και εκείνων από τη μέθοδο KASP (Εικ. 1). Η σύγκριση βασίστηκε στους γονότυπους και σε βαθμολογίες, για κάθε δείγμα και για κάθε μέθοδο και ανατέθηκε σε 11 ανεξάρτητους ειδικευμένους αξιολογητές. Τους ζητήθηκε να προσδιορί-

σουν τον γονότυπο του κάθε δείγματος (N=81) και να βαθμολογήσουν από το 1 μέχρι το 4 (Πίν. 1), ανάλογα με την ποιότητα εμφάνισης της αντίστοιχης ζώνης DNA στο πήκτωμα αγαρόζης. Για την βελτίωση της αξιοπιστίας της αξιολόγησης, οι αξιολογητές δεν ήταν εμπλεκόμενοι στην μεθοδολογία της έρευνας (i.e., double-blind assessors). Επιπλέον, υπολογίστηκε η μέση τιμή για το κάθε δείγμα για να υπάρχει μια αντιπροσωπευτική τιμή των βαθμολογιών από τους 11 αξιολογητές. Για την σύγκριση των δύο μεθόδων (AS-PCR σε επιτραπέζια οργανολογία και AS-PCR σε 2MoBiL) εφαρμόστηκε η δοκιμή Fisher με τη δημιουργία ενός πίνακα συνάφειας 2x2 χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad και υπολογίστηκε η τιμή p. Για την περαιτέρω αξιολόγηση της εγκυρότητας της μεθόδου 2MoBiL, 10 τυχαία επιλεγμένα δείγματα εξετάστηκαν 7 φορές χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους.

Εφαρμόσαμε τεχνικές μηχανικής εκμάθησης και όρασης υπολογιστή για να δημιουργήσουμε ένα φιλικό σύστημα που να μπορεί να το χρησιμοποιήσει κάποιος εξοικειωμένος με ιατρικά θέματα. Εικόνες από τη μεθοδολογία 2MoBiL χρησιμοποιούνται για να εκπαιδεύσουν μοντέλα ανίχνευσης αντικειμένων βαθιάς μάθησης που να ελέγχουν εάν ταξινομούνται σωστά τα δείγματα ενός ατόμου, ώστε να καθοδηγείται η δοσολογία κάποιου φαρμάκου. Η εγκυρότητα των μοντέλων στοιχειοθετείται χρησιμοποιώντας ένα μικρό σύνολο εικόνων ελέγχου (εικόνες που δεν χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης του συστήματος μηχανικής εκμάθησης) και δεδομένα από πραγματικές δοκιμές που

**Πίνακας 1. Περιγραφή του συστήματος βαθμολόγησης των αποτελεσμάτων της μεθόδου AS-PCR επί του 2MoBiL και της επιτραπέζιας οργανολογίας.**

Βαθμολογία	Περιγραφή
'1'	Δείγματα στα οποία ο γονότυπος είναι δύσκολο να αναγνωριστεί ή είναι λάθος συγκριτικά με την πρότυπη μέθοδο, και το δείγμα πρέπει να επανεξεταστεί
'2'	Δείγματα με αμφίβολο γονότυπο
'3'	Δείγματα με ορθό γονότυπο, μέτριο θόρυβο και μικρή πιθανότητα παρερμηνείας
'4'	Δείγματα με ορθό γονότυπο και άνευ θορύβου, μη επιδεχόμενα παρερμηνείας

διενεργήθηκαν από τρεις φοιτητές Ιατρικής, με χρήση του διαδικτυακού συστήματος (<http://hairprocrates.com>) το οποίο παρέχει όλες τις οδηγίες (step-by-step guidance) για την πειραματική μεθοδολογία χρησιμοποιώντας το φορητό εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας. Μετά το τέλος του πειράματος, φωτογράφησαν τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των δειγμάτων και ανέβασαν την φωτογραφία στο ανάλογο πεδίο της πλατφόρμας (<http://hairprocrates.com>) όπου το σύστημα εξάγει την πρόταση για τροποποίηση της χορηγούμενης δοσολογίας για κάθε δείγμα ασθενούς.

### Αποτελέσματα

Συνολικά, πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση σε 81 δείγματα χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους: AS-PCR στο 2MoBiL και στην επιτραπέζια οργανολογία κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για ένα ενδεικτικό αριθμό δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι γονότυποι τριών (3) δειγμάτων όπως προέκυψαν από την πρότυπη μέθοδο (KASP) και τις δύο συγκρινόμενες, οι οποίες έδωσαν αποτελέσματα υψηλής ακρίβειας. Επιπλέον, στην Εικόνα 2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όπως προέκυψαν για τρία δείγματα ακολουθώντας τα πρωτόκολλα για την AS-PCR σε επιτραπέζια οργανολογία (A) και στο 2MoBiL (B). Στο σύστημα βαθμολόγησης (Πιν. 1) των 81 δειγμάτων, εκτιμήθηκαν επίσης τα ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των δύο (2) μεθόδων συγκριτικά με την πρότυπη (KASP). Όσον αφορά την επιτραπέζια οργανολογία, τα 77 από τα 81 δείγματα (95%) έλαβαν βαθμολογία 3 και 4 και ταυτοποιήθηκαν σωστά σύμφωνα με τους γονότυπους από την πρότυπη μέθοδο (KASP). Όσον αφορά τη μέθοδο 2MoBiL παρατηρήθηκε ένα ποσοστό συμφωνίας 94% με την πρότυπη μέθοδο (76 από τα 81 δείγματα παρουσίασαν βαθμολογία 3 και 4, ταυτοποιήθηκαν σωστά και υπο-

βλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση).

Για να εκτιμηθεί αν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά ανάμεσα στις δύο μεθόδους στα ίδια δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Fisher's. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, οι βαθμολογίες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τις ΛΑΘΟΣ τιμές, ενώ οι βαθμολογίες 3 και 4 αντιπροσωπεύουν τις ΣΩΣΤΕΣ. Η στατιστική ανάλυση ξεκινάει με την μηδενική υπόθεση ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις μεθόδους AS-PCR σε επιτραπέζια οργανολογία και σε 2MoBiL. Όπως αναμενόταν, η τιμή p βρέθηκε υψηλότερη από 0,05, οπότε η μηδενική υπόθεση δεν απορρίπτεται και η διαφορά μεταξύ των δύο εξεταζόμενων μεθόδων γονοτύπησης δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως, η προτεινόμενη μέθοδος γονοτύπησης AS-PCR επί του 2MoBiL μπορεί να οδηγήσει σε αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά της επιτραπέζιας οργανολογίας και της πρότυπης KASP. Για περαιτέρω αξιολόγηση της μεθόδου AS-PCR /2MoBiL ως προς την επαναληψιμότητα και την αξιοπιστία, 10 τυχαία επιλεγμένα δείγματα επανεξετάστηκαν 7 φορές το καθένα, με απόλυτη ομοιογένεια στα εκδιδόμενα αποτελέσματα.

### Συζήτηση

Τα μεταφερόμενα εργαστήρια μοριακής βιολογίας μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, είτε κινητά είτε φορητά, λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά τους (δηλαδή το μέγεθος, το βάρος και τις απαιτήσεις παροχών). Σε ένα κινητό εργαστήριο, χρησιμοποιείται το πίσω μέρος του οχήματος, όπως ημιφορητό, φορητό ή ακόμη και λεωφορείο, όπου τοποθετείται ο κατάλληλος εξοπλισμός.

Αντίθετα, ένα φορητό εργαστήριο έχει πολύ μικρότερο μέγεθος, συνήθως μέγεθος βαλίτσας ή smartphone [13, 14]. Οι πειραματικές διαδικασίες σε αυτούς τους τύπους εργαστηρίων είναι πολύ γρηγορότερες [15], ενώ

**Πίνακας 2. Παρουσίαση των γονότυπων για τρία (3) διαφορετικά δείγματα DNA (Α, Β, Γ) για τον μελετώμενο πολυμορφισμό rs4149056, όπως προέκυψαν από την πρότυπη μέθοδο KASP και την AS-PCR σε συμβατική επιτραπέζια οργανολογία και σε 2MoBiL.**

Δείγμα	Αλληλόμορφο Αναφοράς	Μεταλλαγμένο Αλληλόμορφο	Γονότυπος KASP	Γονότυπος AS-PCR σε επιτραπέζια οργανολογία	Γονότυπος AS-PCR σε 2MoBiL
‘Α’	T	C	T T	T T	T T
‘Β’	T	C	T C	T C	T C
‘Γ’	T	C	C C	C C	C C

τέτοια εργαστήρια είτε λειτουργούν με μπαταρία [16] ή παρέχεται ενέργεια από εξωτερική πηγή, πχ από δίκτυο ή από ένα όχημα ή από ηλεκτροπαραγωγό ζεύγος.

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογών φορητών εργαστηρίων είναι για εφαρμογές βιοεπιτήρησης και βιοασφάλειας, ιδίως σε περιπτώσεις επιδημικών συμβάντων. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές και συσκευές για την ανίχνευση του ιού HIV [17], του ιού Ebola [18] και του ιού H1N1 της γρίπης Α [19] και την έγκαιρη διάγνωση τροπικών ασθενειών όπως η ελονοσία [16, 20].

Η ακρίβεια στην ανίχνευση μεταλλάξεων με τη χρήση αυτών των συσκευών συνέβαλε στη διάγνωση της νόσου της αιμοχρωμάτωσης [21] και των μυελοπλασσιαστικών νεοπλασμάτων εντοπίζοντας την μεταλλαγμένη ανθρώπινη αιμοχρωμάτωση p.C282Y και τις μεταλλάξεις JAK2 p.V617F και MPL p.W515K/L [22].

Στην παρούσα μελέτη, αποδείχτηκε ότι το φορητό εργαστήριο 2MoBiL συνιστά μια αξιόπιστη, διαγνωστική πλατφόρμα για την εξατομίκευση της χορήγησης στατίνης [7, 23-24] με σημαντικά πλεονεκτήματα, σε σύγκριση με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα βασισμένες σε συμβατικό εργαστηριακό εξοπλισμό.

Η μέθοδος AS-PCR στο φορητό εργαστήριο 2MoBiL πραγματοποίησε με επιτυχία και ακρίβεια τη γενετική ανάλυση σε ποσοστό 94% έναντι του 95% για την μέθοδο AS-PCR σε επιτραπέζια οργανολογία, με το 100% να αφορά την πρότυπη μέθοδο (KASP). Μικρή απόκλιση από την πρότυπη μέθοδο μπορεί να εξηγηθεί από τυχαίους πειραματικούς παράγοντες, όπως η φθοροχρωστική για την ανίχνευση του πυρηνικού οξέος στην ηλεκτροφόρηση, η οποία συχνά μπορεί να οδηγήσει σε

παρερμηνεία των παρατηρούμενων γονότυπων από τους αξιολογητές. Συνεπώς, τα αποτελέσματα τεκμηριώνουν την ακρίβεια της AS-PCR επί 2MoBiL για διεξαγωγή φαρμακογονιδιωματικών αναλύσεων με μεταφραστική εφαρμογή.

Ένα από τα πλεονεκτήματα του φορητού εργαστηρίου 2MoBiL είναι το δυνητικά χαμηλότερο λειτουργικό κόστος σε σύγκριση την επιτραπέζια οργανολογία ή την ανάλυση KASP, που απαιτούν πολύ πιο εξελιγμένο και ακριβό εργαστηριακό εξοπλισμό πάγκου [25]. Μελέτες κόστους-αποτελεσματικότητας και αναλύσεις χρησιμότητας σε μεγάλο αριθμό ασθενών είναι απαραίτητες στο μέλλον για τις διαφορετικές ρυθμίσεις και εφαρμογές στην παγκόσμια υγεία.

Στην παρούσα μελέτη τεκμηριώθηκε ότι η μέθοδος AS-PCR/2MoBiL μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια αξιόπιστη, διαγνωστική προσέγγιση για την εξατομίκευση της χορήγησης στατίνης με σημαντικές μεταβολές στον κίνδυνο μυοπάθειας που προκαλείται από τη χορήγηση σιμβαστατίνης. Αυτά τα ευρήματα προσφέρουν προοπτικές για εφαρμογές σε άλλες διαγνωστικές προσεγγίσεις για την εξατομίκευση της χορήγησης και άλλων φαρμάκων όπως, η χλωροκίνη και η ρασμπουρικάση, ειδικά για άτομα με ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD [26].

Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να αναπτυχθούν για την εφαρμογή αλγορίθμων που βασίζονται στη μηχανική εκμάθηση (όπως το random forest ή το decision tree) για να αποδώσουν μια βαθμολογία στα αποτελέσματα της γονοτύπησης όπως προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση PCR με τη μέθοδο 2MoBiL. Για παράδειγμα, επόμενες μελέτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν τη θέση των ζωνών του DNA στο πήκτωμα

αγαρόζης, ως προς τις ζώνες του μάρτυρα μοριακών μεγεθών τις οποίες θα μπορούσε να εκπαιδευτεί για να ταξινομήσει ένας αλγόριθμος που βασίζεται σε μηχανική εκμάθηση συνάγοντας τον γονότυπο τους, προορισμένος για χρήση ενδεικτικά και όχι αποκλειστικά σε

απομακρυσμένες και αραιοκατοικημένες περιοχές ή με περιορισμένο προϋπολογισμό και υλικοτεχνικό εξοπλισμό, αφού φυσικά προηγηθούν μελέτες σχετικά με την κλινική εγκυρότητα και την κλινική χρησιμότητά του. ●

## ABSTRACT

# Development of Rapid Pharmacogenomic Testing Assay in a Mobile Molecular Biology Laboratory (2MoBiL)

**Georgios Psarias<sup>1\*</sup>, Evanthia Iliopoulou<sup>1\*</sup>, Ioannis Daramouskas<sup>2</sup>, Ioannis Liopetas<sup>1</sup>, Anna Tsironi<sup>1</sup>, Dimitrios Spanos<sup>1</sup>, Athina Tsirikla<sup>1</sup>, Konstantinos Kalafatis<sup>1</sup>, Dimitra Tarousi<sup>1</sup>, Georgios Varitis<sup>1</sup>, Maria Koromina<sup>1</sup>, Vasileios Kostopoulos<sup>2</sup>, Stavroula Siamoglou<sup>1</sup>, and George P. Patrinos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Patras, School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Laboratory of Pharmacogenomics and Individualized Therapy, Patras, Greece

<sup>2</sup>University of Patras, School of Engineering, Department of Mechanical Engineering & Aeronautics, Laboratory of Applied Mechanics and Vibrations, Patras, Greece

\*These two authors contributed equally to this work.

Pharmacogenomics is rapidly becoming an integral part in modern health care. Still, its broad applicability depends on performing pharmacogenomic testing in various operational settings, including remote areas and/or resource-limited settings. In this study, we describe the development of a rapid and reliable pharmacogenomics assay using a portable molecular biology laboratory, the 2MoBiL (Mobile Molecular Biology Laboratory). We demonstrate that the genotyping of the *SLCO1B1*\*5 pharmacogenomics biomarker can be efficiently and reliably performed using the 2MoBiL portable laboratory, as compared

to conventional benchtop instrumentation and a gold standard genotyping method (KASP assay). Taking into account the compact size of 2MoBiL, and its reliability as demonstrated herein 2MoBiL-based genotyping qualifies for further studies for translational applications in remote areas and resource-limited or time-sensitive concepts. Hence, rapid genotyping by 2MoBiL can be an essential catalyst for widespread implementation of pharmacogenomics and personalized medicine, beyond the confines of a clinic/tertiary care provider.

**KEY WORDS:** pharmacogenomics, genotyping, *SLCO1B1*, portable molecular biology laboratory, 2MoBiL

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:345–7.
- Thorn CF, Klein TE, Altman RB. PharmGKB: The pharmacogenomics knowledge base. *Methods Mol Biol* 2013;1015:311–320.
- Koutsilieri S, Tzioufa F, Sismanoglou DC et al. Unveiling the guidance heterogeneity for genome-informed drug treatment interventions among regulatory bodies and research consortia. *Pharmacol Res* 2020;153:104590.
- Brunham LR, Baker S, Mammen A et al. Role of genetics in the prediction of statin-Associated muscle symptoms and optimization of statin use and adherence. *Cardiovasc Res* 2018, 114(8):1073-1081.
- Khine H, Yuet WC, Adams-Huet B et al. Statin-associated muscle symptoms and SLCO1B1 rs4149056 genotype in patients with familial hypercholesterolemia. *Am Heart J* 2016;179:1–9.
- Stroes ES, Thompson PD, Corsini A et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy - European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J* 2015;36(17):1012-1022.
- Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG et al. The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:112–117.
- Meade T, Sleight P, Collins R et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy - A genomewide study. *N Engl J Med* 2008;359:789–799.
- Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ et al. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:726–373.
- Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ et al. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:873–879.
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571): 68–74.
- Σιαμόγλου, Σ., & Πατρινός, Γ. Π. Το φορητό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας 2MoBiL στην εκπαίδευση μαθητών στο πεδίο της Μοριακής Γενετικής και Εξατομικευμένης Ιατρικής. *Εξατομικευμένη Ιατρική*, 2019;1(1):17-25.
- Zaky WI, Tomaino FR, Pilotte N et al. Backpack PCR: A point-of-collection diagnostic platform for the rapid detection of *Brugia* parasites in mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(11):e0006962.
- Ahrberg CD, Ilic BR, Manz A et al. Handheld real-time PCR device. *Lab Chip* 2016;16(3):586-592.
- Marx V. PCR heads into the field. *Nat Methods* 2015;12:393-397.
- Nair CB, Manjula J, Subramani PA et al. Differential diagnosis of malaria on Truelab Uno®, a portable, real-time, MicroPCR device for point-of-care applications. *PLoS One* 2016;11(1):e0146961.
- Jangam SR, Agarwal AK, Sur K et al. A point-of-care PCR test for HIV-1 detection in resource-limited settings. *Biosens Bioelectron* 2013;42:69-75.
- Kurosaki Y, Magassouba N, Oloniniyi OK et al. Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(2):e0004472.
- Lim S, Nan H, Lee MJ et al. Fast on-site diagnosis of influenza A virus by Palm PCR and portable capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2014;963:134-139.
- Visser BJ, Meerveld-Gerrits J, Kroon D et al. Assessing the quality of anti-malarial drugs from Gabonese pharmacies using the MiniLab®: A field study. *Malar J* 2015;14:273.
- Macleod JA, Nemeth AC, Dicke WC et al. Fast, sensitive point of care electrochemical molecular system for point mutation and select agent detection. *Lab Chip* 2016;16(13)2513-2520.
- Wang H, Zhang X, Xu X et al. A portable microfluidic platform for rapid molecular diagnostic testing of patients with myeloproliferative neoplasms. *Sci Rep* 2017;7(1):8596.
- Teama S. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. *IntechOpen* 2018;i:13.
- Tuteja S, Rader DJ. SLCO1B1 and Statin Therapy. *Circ Genomic Precis Med* 2018;11:e002320.
- Siamoglou, S., Karamperis, K., Mitropoulou, C., & Patriinos, G. P. (2020). Costing Methods as a Means to Measure the Costs of Pharmacogenomics Testing. *J Appl Lab Med* 2020;5(5):1005–1016.
- Ψάριος, Γ., Ηλιοπούλου, Ε., Θεριανού, Μ., Γκιζαριώτη, Ζ., Πατρινός, Γ. Π., Σιαμόγλου, Σ. Εξορθολογισμός της φαρμακευτικής χορήγησης χλωροκίνης και ρασμπουρικής σε ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD. *Εξατομικευμένη Ιατρική* 2020;2(2):65-72.