



Российская Академия Наук

Отделение физиологических наук

М.А. Пальцев

**МЕДИЦИНА БУДУЩЕГО.
ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ
МЕДИЦИНА:
ОПЫТ ПРОШЛОГО,
РЕАЛИИ ЗАВТРАШНЕГО ДНЯ**

Москва
2020

УДК 615.076
ББК 51.12
П14

Пальцев М.А.

«Медицина будущего. Персонализированная медицина: опыт прошлого, реалии завтрашнего дня» / М.: Российская академия наук, 2020.
– 152 с.: 58 ил.

ISBN 978-5-907036-78-9

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	9
ВВЕДЕНИЕ	13
ОТ МЕНДЕЛЯ ДО НАШИХ ДНЕЙ. ИСТОРИЯ СТАНОВЛЕНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ	15
ГЕНЕТИКА, ГЕНОМИКА И ДРУГИЕ ОМИКСЫ	22
Генетика и геномика	22
Эпигенетика и эпигеномика	28
Транскриптомика	31
Протеомика	33
Метаболомика	36
Фармакогеномика и фармакопротеомика	37
ГЕНОМНАЯ МЕДИЦИНА	41
Генная терапия	41
Редактирование генома	45
РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА	48
Клеточные технологии	49
Тканевая инженерия	72
Создание искусственных органов (бионика)	77
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ	80
Блот-гибридизация ДНК по Саузерну	80
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	82
Секвенирование ДНК	89
Биочипы	93
Цитогенетика	96

Транскриптомные технологии	97
Протеомные технологии	98
Метод тканевых матриц	100
Секвенирование последовательности белка	103
БИОИНФОРМАТИКА	104
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ	106
МЕДИЦИНА 4П	111
Предиктивно-превентивная медицина	112
Персонализированное лечение: интеграция диагностики и лечения	116
Персонализированная терапия в онкологии	117
Метод тканевых матриц в персонализированной медицине	121
Эпигенетическая терапия: новый подход к персонализированному лечению	122
Одно лекарство – одному пациенту	123
Партисипативная медицина	125
ЦИФРОВАЯ МЕДИЦИНА	126
Носимые устройства и приложения по управлению здоровьем	126
Биосенсоры и приложения по управлению заболеваниями	132
Биохакинг	134
Телемедицина	137
Блокчейн-технологии	140
Искусственный интеллект	141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	146

ПРЕДИСЛОВИЕ

Тенденции развития современной медицины связаны с достижениями активно разрабатываемого направления – персонализированной медицины, медицины индивидуального здоровья. Персонализированная медицина – это новая концепция медицины, в основе которой лежат принципы выявления предрасположенности к развитию заболевания, предотвращения или минимизации риска развития болезни и персонализированной фармакотерапии уже развившегося заболевания. Именно персонализированная медицина будет основой медицины будущего.

Рост числа неинфекционных заболеваний, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые, онкологические, нейродегенеративные и эндокринные заболевания, беспрецедентное снижение среднего возраста начала этих заболеваний диктует необходимость смены парадигмы от отсроченных, дорогостоящих, но часто неэффективных медицинских услуг к целостному подходу с помощью прогностической, профилактической и персонализированной медицины, демонстрирующей преимущества для каждого отдельного человека и общества в целом.

Другой предпосылкой развития персонализированной медицины является низкая эффективность традиционной фармакотерапии, высокая частота нежелательных лекарственных реакций, а также повышение запросов общества на повышение эффективности медицинской помощи.

Основой для развития персонализированной медицины послужило развитие биомедицинской науки и углубление знаний молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий. Биомаркеры, специфичные для каждого конкретного пациента и каждого конкретного заболевания, станут индикаторами заболевания и мишенью для индивидуальной терапии. Выявление указанных биологических маркеров перспективно при использовании современных технологий, таких как геномика, транскриптомика, эпигеномика, протеомика, метаболомика. Данные технологии позволяют анализировать большой массив данных и обнаружить уникальные патоморфологические изменения, характерные для заболеваний каждого конкретного человека. В этом случае можно подобрать персонализированное лечение, которое будет более эффективным. Однако наибольший успех персонализированной медицины связан с активным участием самого пациента в профилактике возможных заболеваний и их лечении.

Пациенты с такими тяжелыми хроническими заболеваниями, как сахарный диабет, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, начинают получать лечение уже после начала заболевания, часто на терминальной стадии. Согласно пессимистическому прогнозу в ближайшие 10–20 лет разовьется пандемия сахарного диабета II типа, нейродегенеративных заболеваний и некоторых видов онкологических заболеваний.

Персонализированная медицина является новой интегративной концепцией здравоохранения, она позволяет прогнозировать индивидуальную предрасположенность к определенному набору болезней. Это позволит выбрать целевые профилактические мероприятия и обеспечить индивидуальное лечение. Проведение эффективного скрининга населения будет способствовать выявлению лиц из группы риска, проведению оптимальной терапии, снижению частоты неблагоприятных лекарственных реакций, что будет способствовать ранней профилактике заболеваний. А в случае развития заболевания будет осуществляться подбор лекарственных средств в зависимости от молекулярного портрета пациента. Благодаря этому врач сможет выбрать наиболее эффективное и безопасное лекарственное средство, а также его дозировку. Такой подход не только повысит эффективность терапии и снизит частоту развития нежелательных реакций, но и снизит расходы на дорогостоящие лекарственные средства, которые могут оказаться неэффективными при их эмпирическом выборе.

Этический императив персонализированной медицины состоит в том, чтобы определить правильного пациента, получающего правильное лекарство в правильной дозе в нужное время.

Принципы, лежащие в основе персонализированной медицины, позволят не только повысить эффективность и безопасность профилактических и медикаментозных мер, но и сократить расходы на дорогостоящие процедуры, применяя их только у целевых групп.

Зарубежный опыт персонализации профилактических и лечебных мероприятий позволяет говорить о том, что данный подход может оказать существенное влияние на демографическую ситуацию в различных странах мира, а также позволит снизить затраты за счет исключения неэффективных профилактических и лечебных мероприятий.

С целью пропаганды идеологии персонализированной медицины в 2009 году в Европе начала свою работу Европейская ассоциация предиктивно-превентивной и персонализированной медицины (EPMA- European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine – <http://www.epmanet.eu/>). Главная цель EPMA заключается в совершенствовании и в продвижении в практическое здравоохранение основополагающих принципов здравоохранения с акцентом на прогнозирование, профилактику и персонифицированный подход к пациенту с целью улучшения качества жизни людей.

Книга основана на профессиональном опыте автора и рассматривает основные направления развития медицины будущего, в основе которых лежит концепция персонализированной медицины. Читатели смогут познакомиться с эволюцией медицинской науки и основными этапами становления персонализированной медицины.

В книге подробно представлены молекулярно-биологические методы персонализированной медицины, а также роль омиксных технологий для

поиска молекулярных биомаркеров. Молекулярная диагностика является ключевым инструментом при изучении персонализированных механизмов заболевания и эффективной терапии, а биомаркеры, наряду с клинической и экологической информацией, расширяют возможности врачей и делают медицинскую помощь максимально индивидуализированной. Путём выявления биомаркеров возможно не только раннее обнаружение заболевания и выбор надлежащего лечения, являющееся безопасным и эффективным, но и мониторинг результатов лечения, а также определение прогноза развития заболевания.

Успехи, достигнутые в области геномной и регенеративной медицины, не могли не привлечь к себе внимание практических врачей. Количество клинических исследований в этих направлениях медицины стремительно растёт. Это указывает на перспективность данных исследований, которые несомненно займут важную нишу в медицине будущего. Автором подробно освещены вопросы, касающиеся генной терапии. Рассмотрены заболевания, лечение которых целесообразно проводить с помощью методов генной терапии – это онкологические, сердечно-сосудистые, инфекционные и моногенные заболевания. Представлена стандартная схема геннотерапевтической технологии, указаны перспективные векторы для доставки генетического материала.

Отдельное внимание уделено новой технологии – редактированию генома. С помощью эндонуклеаз непосредственно в клетке возможна репарация мутации. Это достаточно оригинальная и несложная в исполнении технология может произвести революцию в молекулярной медицине. Конечно, клиническое применение технологий редактирования генома – это медицина будущего, так как потребуются много времени по изучению эффективности и безопасности этой технологии.

Медицина будущего не может быть полной без упоминания исследований в области регенеративной медицины. На страницах этой книги можно познакомиться с основными направлениями исследований в области регенеративной медицины. Это клеточные технологии, тканевая инженерия, создание искусственных органов (бионика). Клеточные технологии имеют огромный, еще малоизученный потенциал для лечения неинфекционных заболеваний, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания и др. Открытие способа перепрограммирования дифференцированных клеток в эмбриональные позволяет избежать сложных этических вопросов и безгранично расширяет возможности клеточной терапии.

Тканевая инженерия - междисциплинарная область регенеративной медицины. Благодаря технологиям тканевой инженерии возможно создание живых, неискусственных, тканей и органов. Поэтому успех этих технологий во многом определяется высокотехнологичными материалами, пригодными для выращивания на них стволовых клеток. Появление технологий

биопринтинга позволяет получить трехмерные биоинженерные тканевые конструкции, которые имитируют сложную организацию биологических органов и тканей. С помощью технологий тканевой инженерии уже в ближайшем будущем возможна регенерация поврежденных тканей и органов.

Геномная и регенеративная медицина – яркий пример персонализированного подхода к терапии большинства заболеваний.

В развитии персонализированной медицины и становлении медицины будущего важная роль принадлежит цифровой медицине и цифровому здравоохранению. В книге рассмотрены основные тенденции развития цифровых медицинских технологий. Внедрение цифрового здравоохранения обусловлено переходом от использования средних значений по небольшой выборке к анализам «больших данных» по миллиардам значений показателей, сгенерированных по каждому человеку. Цифровое здравоохранение направлено на то, чтобы повысить эффективность и качество оказываемой медицинской помощи.

Расширение здравоохранения за пределы стационарного и амбулаторного лечения и активное вовлечение в процесс пациентов для сохранения и улучшения здоровья дома и на работе с помощью фитнес-браслетов, устройств для мониторинга здоровья приобрели популярность во всем мире, позволяя людям в любой момент в режиме реального времени получать важные данные о своем здоровье.

В области диагностики и лечения сложных заболеваний внедрение телемедицинских технологий позволяет предоставлять высококвалифицированную врачебную помощь для населения, проживающего на территориях, где постоянное пребывание медицинских специалистов ограничено в силу географических или экономических причин. Практика проведения удаленных врачебных консультаций с использованием видеотрансляций с одновременной передачей важнейших биометрических параметров пациента при помощи интернета позволяет привлекать высококвалифицированных врачей.

Блокчей-технологии будут перспективны как массивное хранилище генетической и протеомной информации населения. Они позволят анализировать врачебные назначения, количество и качество фармацевтических препаратов.

Искусственный интеллект, благодаря неограниченному доступу к различным базам данных, уже сегодня является помощником врача в постановке диагноза.

Книга ориентирована на врачей общей практики, специалистов в области лечения онкологических, инфекционных и неинфекционных заболеваний, генетиков, врачей лабораторной диагностики, студентов медицинских вузов, а также для читателей, заинтересованных в повышении своей медицинской грамотности.

Академик М.А. Пальцев

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	– комплементарная ДНК
мтДНК	– митохондриальная ДНК
ЕСИА	– единая система идентификации и аутентификации
ИПСК	– индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
Медицина 4П	– предиктивно – превентивная, персонализированная и партисипативная медицина
МРТ	– магнитно-резонансная томография
МФЗ	– мультифакториальные заболевания
ОТ-ПЦР	– полимеразная цепная реакция с обратнo-транскриптазной реакцией
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПК	– прогениторные клетки
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
мРНК	– матричная РНК
рРНК	– рибосомная РНК
тРНК	– транспортная РНК
lncRNA	– длинная некодирующая РНК
miRNA	– микроРНК
siRNA	– малая интерферирующая РНК
РС	– рассеянный склероз
СД	– сахарный диабет
СК	– стволовые клетки
СКА	– серповидно-клеточная анемия
СПИД	– синдром приобретенного иммунодефицита
ТКИД	– тяжёлый комбинированный иммунодефицит
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс
ASCO	– Американское общество медицинской онкологии

- BAD** – антагонист Bcl-2, кодируется геном BAD (от англ. Bcl2-associated agonist of cell death, короткая аббревиатура BAD)
- BAX** – проапоптотический белок семейства BCL-2, кодируемый геном BCL2L4 (от англ. BCL2 associated X protein)
- BCL-2** – антиапоптотический белок, кодируется одноименным геном (от англ. B-cell lymphoma)
- BCL-W** – BCL-2-подобный белок 2, у человека кодируется геном BCL2L2.
- BCL-XL** – антиапоптотический белок (от англ. B-cell lymphoma-extra large)
- BFL-1** – антиапоптотический белок семейства BCL-2
- BID** – проапоптотический белок семейства BCL2
- BIM** – проапоптотический белок семейства BCL2, кодируется геном BCL2L11
- BMPs** – костные морфогенетические белки (от англ. bone morphogenetic proteins)
- CD** – кластер дифференцировки (от англ. cluster of differentiation) – номенклатура дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека
- CNV** – вариации числа копий в геноме человека (от англ. Copy number variation)
- CRISPR** – это специализированные участки ДНК, состоящие из повторяющихся последовательностей, разделенных уникальными последовательностями – спейсерами (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – кластеры регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов).
- CYP** – общее название ферментов семейства P450
- CXCL12** – хемокин (от англ. Stromal Cell-Derived Factor-1, SDF-1) продуцируется ретикулярными клетками, активирует миграцию и созревание многих клеток в костном мозге. Наряду с CCL21 и CCL25 он обеспечивает миграцию тимоцитов в тимус. CXCL12 связывается с рецептором CXCR4.
- DGGE** – денатурирующий градиентный гель-электрофорез (от англ. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
- ESTs** – прочитанные фрагменты экспрессированных последовательностей» (о англ. Expressed Sequence Tags)
- FDA** – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (от англ. Food and Drug Administration)
- Flt3** – CD135 или fms-подобная тирозинкиназа 3 (англ. fms like tyrosine kinase 3 (FLT-3)) – мембранный белок, рецептор цитокинов, относится к рецепторным тирозинкиназам III класса

FISH	– флуоресцентная гибридизация in situ
GWAS	– технологии с высоким разрешением, основанные на микрочипах (от англ. Genome – Wide Association Studies – полногеномный поиск ассоциаций)
HA	– метод анализа гетеродуплексов (Heteroduplex)
HDA	– метод анализа гетеродуплесов (от англ. Heteroduplex analysis)
Ноxa3	– гомеобокс-фактор транскрипции (от англ. Homeobox Protein A3)
HLA	– человеческие лейкоцитарные антигены, или система тканевой совместимости человека (англ. HLA, Human Leukocyte Antigens) – группа антигенов гистосовместимости, главный комплекс гистосовместимости (далее МНС) у людей.
JAK-STAT3	– система Janus-киназы в комплексе со STAT – сигнальный фактор активации транскрипции (от англ. Signal transducer and activator of transcription)
Ki-67	– фактор пролиферации
LIF	– лейкоэмический ингибиторный фактор (от англ. leukemia inhibitory factor)
MALDI-TOF	– матричная ассоциированная лазерная десорбция/ионизация (от англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight)
MCL-1	– белок семейства BCL-2, кодируется геном MCL-1 (от англ. Myeloid Cell Leukemia)
MDR1	– гликопротеин, обеспечивает устойчивость к лекарственным препаратам, кодируется геном MDR1 (от англ. Multiple Drug Resistance)
MODY	– диабет взрослого типа у молодых (от англ. Maturity-onset diabetes of the young)
MPSS	– массовое одновременное секвенирование характерных фрагментов (от англ. Massively Parallel Signature Sequencing)
Nanog	– транскрипционный фактор. Назван шотландцем Яном Чемберсом в честь кельтской мифической земли вечной юности – Tír na nÓg
NCCN	– Национальная комплексная онкологическая сеть США
NGS	– секвенаторы следующего поколения (англ. next-generation sequencing)
NOXA	– проапоптотический белок, кодируется геном NOXA1 (от англ. NADPH Oxidase Activator)
Oct-4	– транскрипционный фактор, содержащий гомеобокс (от англ. Octamer-4)
Pax1	– транскрипционный фактор (от англ. Paired box)

PGC	– первичные зародышевые клетки (от англ. primarygerminalcells)
PUMA	– проапоптотический белок семейства Bcl-2 (англ. p53 upregulated modulator of apoptosis)
RBP s	– РНК-связывающие белки
RNA-seq	– секвенирование РНК
RT-qPCR	– количественная ПЦР с обратной транскриптазной реакцией
Runx3	– фактор транскрипции-3 (от англ. runt-related transcription factor 3)
SAGE	– серийный анализ экспрессии генов (от англ. Serial analysis of gene expression)
SOX2	– белок, относящийся к семейству Sry-связанных факторов транскрипции
SNP	– однонуклеотидный полиморфизм (от англ. single Nucleotide Polymorphism)
SSCP	– метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (от англ. Single Strand Conformation Polymorphism)
TALEN	– ферменты рестрикции, которые могут быть сконструированы для разрезания определенных последовательностей ДНК (от англ. Transcription activator-like effector nucleases)
TGF	– трансформирующий фактор роста (англ. transforming growth factor)
TPMT	– Тиопурин S-метилтрансфераза

ВВЕДЕНИЕ

«Диагностика достигла таких успехов, что здоровых людей практически не осталось»

Bertrand Arthur William Russell

(1872–1970)

История медицинской науки представляет собой непрекращающийся процесс борьбы с заболеваниями человека. Долгие годы главным сдерживающим фактором для развития человечества были инфекционные болезни. Ситуация радикально изменилась с развитием профилактической медицины, включающей крупномасштабные мероприятия по иммунизации населения и, безусловно, с открытием антибиотиков. До появления СПИДа казалось, что инфекционные болезни в мире в целом успешно контролируются.

Вместе с тем, если исключить все многочисленные инфекционные заболевания, учитывая при этом возможность появления новых патогенов, остается большое количество болезней, развивающихся как бы сами по себе. В основе патогенеза таких идиопатических заболеваний лежат специфические нарушения в бесчисленном количестве молекул, из которых состоит организм человека. Значительная часть этих болезней генетически обусловлена. Человеческое существование связано с бесперебойной работой сотен тысяч разнообразных генов, определяющих производство и функционирование самых разнообразных белков. Генетические дефекты, приводящие к нарушению работы любого из этих белков, могут иметь самые серьезные последствия.

В течение последних 300 лет росло и развивалось понимание того, как человеческое тело функционирует в состоянии здоровья и болезни. Однако это понимание и знание не росли непрерывно и плавно. Развитие медицины сопровождалось неожиданными открытиями, которые приводили к скачкообразным изменениям в методах и технологиях. Большинство этих ключевых достижений медицины были бы невозможны без соответствующего уровня развития технологий.

В качестве примера можно вспомнить открытие Александром Флемингом первых двух антимикробных препаратов – лизоцима в 1922 году и пенициллина в 1928 году. Оба открытия были связаны со счастливым случаем, и оба не были бы сделаны, если бы Флеминг не умел культивировать бактерии на плотной питательной среде. Использование агара для этих целей было введено в микробиологическую практику Робертом Кохом в 1822 году. Вооруженный этой, чисто микробиологической, технологией, Роберт Кох и, позже, Луи Пастер смогли сформулировать принципы патогенеза инфекционных заболеваний, ставшие основой современной медицинской микробиологии. В свою очередь, работы Пастера и Коха основывались на

открытии бактерий Антоном ван Левенгуком в 1683 году и были бы не возможны без микроскопа. Левенгук же создал свой первый микроскоп, опираясь на изобретения Ханса и Захария Янсенов (1595 г.). Разработка современных анестетиков началась с открытия анестезирующего действия эфира, сделанного Кроуфордом Лонгом в 1842 году, однако оно было бы невозможным без знания метода синтеза эфира, впервые описанного немецким ученым Валерием Кордусом в 1540 году. Таким образом, любое достижение медицины имеет в своей истории ряд событий, связанных с технологическими достижениями в таких областях, как физика, химия и биология.

С 70-х годов прошлого столетия мы являемся свидетелями беспрецедентного количества медицинских изобретений, отражающих углубление нашего понимания молекулярных основ здоровья и болезни. При том, что химия и физика, безусловно, сыграли свою роль, большинство этих изобретений является прямым результатом двух технологических революций в биологии: технологии использования рекомбинантной ДНК и геномики. Первым результатом, достигнутым благодаря технологии рекомбинантной ДНК, стала возможность выделения и характеристики отдельных генов. Медицинский аспект этого достижения состоит в возможности обнаружения связи отдельных генов с заболеваниями человека, исследовании генома возбудителей и родственных генов животных. Одновременно с развитием фундаментальных знаний о молекулярной основе заболеваний человека развивается новая область медицины, названная персонализированной медициной, которая стала непосредственным практическим применением технологий молекулярной медицины к предупреждению, диагностике и лечению заболеваний человека.

ОТ МЕНДЕЛЯ ДО НАШИХ ДНЕЙ. ИСТОРИЯ СТАНОВЛЕНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

С точки зрения развития фундаментальных знаний, история молекулярной медицины началась с открытия генов. Жизнь всякого живого организма, начиная с простейших одноклеточных до человека, контролируется генами. Они определяют любую реакцию клеток, их деление, рост и развитие организма, как в норме, так и в патологии. Возможность манипулирования наследованием таких биологических признаков, как рост и предрасположенность к болезням, была замечена еще во времена, когда о генах ничего не было известно. Эта манипуляция тогда называлась селекцией и проводилась на уровне наблюдения за животными и растениями и скрещивания тех, которые обладали необходимыми человеку признаками. Практический опыт показывал возможность изменения одних свойств селекционируемого организма, не затрагивая при этом других его качеств. Идея о наличии неких единиц наследственности опирается на практический опыт многих поколений животноводов и растениеводов.

Эта идея была подтверждена в середине XIX столетия **Грегором Менделем**. Классические эксперименты Менделя с зеленым горошком *Pisum sativum*, описанные в его работе «*Versuche über Pflazen-Hybriden*» («Опыты с гибридами растений»), 1865 г.) стали основой медицинской генетики конца XX века. Результаты этих опытов позволили сформулировать гипотезу о наличии генов, определяющих признаки, аллелей, от которых зависит проявление этого признака и половых клеток, через которые происходит передача признака потомству. Им были введены важнейшие понятия фенотипа и генотипа. Работы Менделя были подготовлены исследованиями таких экспериментаторов XVIII-начала XIX вв., как, например,



Грегор Иоган Мендель

(нем. Gregor Johann Mendel; 20 июля 1822, Хейнцендорф, Силезия, Австрийская империя – 6 января 1884, Брюнн, Австро-Венгрия). Биолог и ботаник. Является основоположником учения о наследственности.

Карл ван Гартнер, разработавших подходы к селекции и созданию гибридов растений, определивших роль таких факторов, как ветер и опыление насекомыми в скрещивании растений. Последний работал на том же объекте, что и Мендель, и описал качественные изменения, которые затем были им разработаны и описаны. Однако именно Мендель заметил и описал закономерности, которые стали стимулом к последующему развитию не только генетики, но и всей биологии.

Теория эволюции, опубликованная в 1859 году, не могла бы возникнуть без понимания Дарвиным роли наследственности. В книге Дарвина «Изменения у животных и растений при одомашнивании», опубликованной на два года позднее знаменитой работы Менделя, Дарвин предположил, что каждая часть тела постоянно производит собственные копии, которые он назвал «геммулы».

В 1890-х годах Карл Корренс в Германии и Хьюго де Вриз в Голландии независимо пришли к тем же заключениям, что и Мендель. Менделевские гены, так же как и дарвиновские «геммулы», были умозрительными образами, а подтверждение их идей появилось позднее, когда возникли и развились соответствующие технологии.

Величайший английский врач-исследователь Вильям Гарвей предположил, что все животные происходят «ab ovo», то есть из яйца, которым в случае живородящих является яйцеклетка. Ранее, в 1677 году, Левенгук описал сперматозоид, который был им обнаружен в семени животных и человека. Более двухсот лет прошло со времен исследований Левенгука, когда была принята идея о том, что наследственность передается совокупностью женских яйцеклеток и мужских сперматозоидов.

XIX век стал периодом, непосредственно предшествовавшим созданию клеточной теории. В 1840-х годах два немецких биолога Маттиас Шлейден и Теодор Шванн предположили, что все растения и животные состоят из огромного количества микроскопических автономных единиц, названных клетками. Собственно клетки были также описаны Левенгуком, однако их функциональное значение оставалось неясным до работ Шлейдена и Шванна. За последующие двадцать лет было установлено, что все ткани тела, включая гонады, состоят из клеток. Затем были открыты органеллы клеток: в первую очередь, ядро. Достаточно быстро было замечено, что при разрезании одноклеточного организма на две части, к дальнейшему делению остается способной лишь часть, содержащая ядро.

В течение 80-х годов XIX века серия экспериментов, проведенных немецкими учеными, позволила обнаружить внутриядерные структуры, связанные с наследственностью. Эти компоненты, названные хромосомами, впервые были описаны Фредериком Шнайдером в 1873 году как волокнистая масса, ассоциированная с ядром и наблюдаемая при клеточном делении. С улучшением качества микроскопов стало возможным более детальное описание стадий деления клетки, которое было осуществлено

Вальтером Флемингом в 1882 году и названо митозом. Флемминг ввел термины «хроматин», «диплоид» и «тетраплоид».

В 1876 году Оскар Гертвиг описал процесс формирования зиготы и предположил, что в половых клетках не происходит удвоение хромосомного набора с формированием тетраплоида. В 1887 году это предположение подтвердил Август Вейсман, показав, что в результате мейоза образуется гаплоидная клетка, способная также к обмену генетической информацией с другой гаплоидной клеткой путем кроссинговера. К концу 1900-х годов было показано, что поведение хромосом во время мейоза соответствует поведению гипотетических генов Менделя. Последний шаг был сделан Вальтером Саттоном, который в 1903 году высказал идею, что ген является физической единицей хромосомы. А каждая клетка данного организма обладает определенным набором генов, собранных в набор хромосом. Этот набор состоит из дублированных хромосом, одна из которых получена из отцовской, а другая из материнской клетки. В течение нескольких лет произошло «переоткрытие» законов Менделя, его опыты получили должную оценку, и он навсегда занял свое место среди тех гигантов науки, на чьих плечах стоят современные исследователи-генетики.

Собственно понятия «геном» и «генетика» были введены в 1906 году. Следующие пятьдесят лет ученые решали вопрос «Что такое на самом деле гены?» и «Как работают гены?» Не один лауреат Нобелевской премии получил свою награду за работы, позволяющие сделать новый, пусть порой совсем крохотный, шаг на пути к ответам на эти вопросы.

Среди направлений, по которым идут исследователи, есть путь биохимических исследований. Стремление найти материальную основу всей жизни и человека в ней как существа материального мира, в котором протекают химические реакции, подобные тем, что происходят в неживом мире и растениях, привело к развитию биохимии.

Несмотря на то, что наш физический мир состоит из сотен атомов, кажется невероятным, что для создания живого организма необходимо использование всего шести из них: углерода, водорода, кислорода, азота, серы и фосфора. Вначале важнейшим открытием казалось, что именно эти молекулы обра-



Дж. Уотсон (слева) и Ф. Крик (справа) – открытие двуспиральной молекулы ДНК (фотография 1953 года).

зуют очень большие комплексные структуры, названные биологическими макромолекулами.

К середине 1860-х годов были идентифицированы три больших их группы: белки, которые, в свою очередь, состоят из ограниченного количества аминокислот, углеводы, включающие простые и сложные сахара, и липиды, в том числе водонерастворимые жиры. В 1868 году Иоганном Фредериком Мишером в яйцеклетках и сперматозоидах лосося была открыта еще одна группа биологических макромолекул, которая в 1889 году получила название «нуклеиновые кислоты». В 1940-х годах Авери с коллегами впервые показали, что генетическая информация бактерий *Pneumococcus* содержится в их ДНК. В свою очередь, эти выводы были бы невозможны без детальной проработки вопроса о материальном носителе наследственной информации, проведенной гениальным отечественным исследователем Н. Тимофеевым-Ресовским и его учениками.

Последующие работы Д. Франклина и М. Уилкинса и, наконец, работы Дж. Уотсона и Ф. Крика в 1950-х годах привели к окончательному пониманию двухцепочечной структуры ДНК. В середине 50-х годов А. Корнберг открыл фермент ДНК-полимеразу, позволяющий синтезировать небольшие фрагменты ДНК. Дальнейшие открытия в этой области посыпались как из рога изобилия. В 1960-х годах произошло открытие мРНК, обеспечивающей связь между ядром и участком синтеза белка в цитоплазме, и внехромосомного элемента генома бактерий – плазмиды, которые участвуют в передаче генов, определяющих антибиотикорезистентность микроорганизмов. Это открытие позволило развиваться отдельной области молекулярной технологии – генной инженерии. Поворотным пунктом этого десятилетия стало определение генетического кода, который показал, что



Структура ДНК, писали Уотсон и Крик, состоит, таким образом, из двух цепочек, каждая из которых является комплементарной по отношению к другой.

каждая аминокислота кодируется в ДНК триплетом нуклеиновых кислот.

В эти годы сформировалась концепция «один ген – один белок», а также аксиоматическая цепочка ДНК→РНК→белок. Однако последующее открытие обратной транскриптазы Х. Темным и Д.Балтимором в 1970 году опровергло эту догму. Этот фермент, обнаруженный в РНК некоторых вирусов, называемых ретровирусами, позволяет делать

копии ДНК с РНК. Обратная транскриптаза (ревертаза) обеспечивает интеграцию генетического материала ретровирусов в геном клетки-хозяина. Этот фермент позже начал использоваться в молекулярной медицине и биологии для продукции большого количества копий ДНК с одного матричного участка РНК, что является основой метода ПЦР (полимеразной цепной реакции).

В конце 1960-х – начале 1970-х годов Смит с коллегами выделили эндонуклеазы рестрикции, которые способны расщеплять ДНК на специфических участках, определяемых последовательностью нуклеотидов. Эти ферменты в настоящее время применяются для продукции участков ДНК определенной длины. В 1968 году М. Мезелсен с соавторами показали, что способность одного из штаммов *E.coli* сдерживать размножение инфицирующего его вируса (бактериофага) обуславливается наличием в клетке фермента, который расщепляет фаговую ДНК. В 1972 г. Дж. Мерц и Р. Дэвис установили, что этот фермент, рестриктаза RI (EcoRI), расщепляет молекулу ДНК в специфическом сайте с образованием комплементарных («липких») концов. Линейные молекулы, образовавшиеся при этом, часто вновь замыкаются в кольцо, а объединившиеся фрагменты удерживаются вместе водородными связями. Их концы можно ковалентно сшить, добавив ДНК-лигазу. Примерно в это же время был описан еще один фермент – ДНК-лигаза, который позволяет соединяться отдельным фрагментам ДНК, в результате чего получается кольцевая молекула. Мерц и Дэвис сделали вывод, что «...последовательно используя рестриктазу RI и ДНК-лигазу можно «перекombинировать» любые две молекулы ДНК с RI-сайтами и получить гибридную молекулу». Это открытие указало простой путь создания специфических рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*.

На основании всех этих открытий в 1980 году была впервые создана молекула рекомбинантной ДНК. Автор этого открытия П.Берг был удостоен Нобелевской премии, и это лишь один из блистательного списка нобелевских лауреатов, чьи открытия сыграли важную роль в развитии молекулярной медицины.

В 1972 году Стэнли Коэн с соавторами показали, что фрагмент ДНК может быть вставлен в плазмиды, которые затем способны включаться в бактерии. Коэн писал: «Есть надежда, что удастся ввести в бактериальную клетку *E.coli* гены, ассоциированные с метаболическими и синтетическими функциями, присущими другим биологическим видам, например, гены фотосинтеза или продукции антибиотиков».

Репликация бактерии, чей геном содержит чужеродную ДНК, приводит к выработке неограниченного количества этих фрагментов, то есть ДНК может быть клонирована. Первый эукариотический ген, подвергшийся клонированию в 1976 году, был геном кроличьего β-глобина. Этим было положено начало генно-инженерному производству, получившему в наше время столь широкое распространение.

Разработка другой технологии – ДНК-зондов – началась с 1960 года, когда было обнаружено, что двухцепочечная ДНК может быть разделена и затем вновь восстановлена (гибридизация). Зонды, содержащие небольшие фрагменты ДНК, меченые радиоактивной меткой, например ^{32}P , можно идентифицировать в специфических регионах ДНК в результате их присоединения к комплементарной нуклеотидной последовательности. Специфичность реакции гибридизации основывается на строгой комплементарности пар аденин-тимин, гуанин-цитозин. Гибридизация в растворе вскоре уступила место технологии гибридизации на плотной мембране, на которой ДНК, расщепленная при помощи эндонуклеаз рестрикции, переносится на мембраны с использованием Саузерн-блоттинга, технологии, разработанной Е.М. Саузерном в 1975 году. Способность радиоактивно-меченого ДНК-зонда идентифицировать специфические фрагменты эндонуклеаз рестрикции позволила создавать карты ДНК, и это стало основой для создания технологии мутационного анализа ДНК.

В 1970-х годах развитие молекулярной медицины было отмечено возрастающим интересом как научной общественности, так и общества в целом к генетической инженерии. В этой отрасли сторонники видели огромные перспективы и источник новых благ для человечества, противники же – новую «атомную бомбу», то есть источник величайшей угрозы с непредсказуемыми последствиями. В 1975 году в Калифорнии была собрана Конференция по вопросам генетической инженерии, на которой были сформулированы основные принципы работы с ДНК человека. Эти принципы жестко ограничивали и определяли приемлемые виды экспериментов, типы бактериальных и вирусных организмов, безопасные для здоровья человека. Эти пределы были несколько раздвинуты в конце 1970-х – начале 1980-х годов, когда было доказано, что при соблюдении правил работы генно-инженерные технологии не представляют угрозу для человечества. В настоящее время эти принципы преобразованы в соблюдение правил медицинской этики в области молекулярной медицины и контроль со стороны государственных и общественных организаций. Этика включает в себя систему моральных принципов, по которым человеческие действия и планы могут быть оценены в категориях добра и зла, а также нормы и правила поведения, соответствующие принципам уважения ко всем слоям и отдельным классам людей. Основой для разработки основ медицинской этики стала Декларация прав человека, принятая в Хельсинки в 1964 году. Несмотря на то, что в 1989 году была принята новая редакция, основные принципы остались неизменными и все последующие работы в области молекулярной медицины ведутся в соответствии с ее требованиями.

В 1975 и 1977 годах были разработаны два новых подхода к определению нуклеотидных последовательностей в ДНК. Важность этих достижений была отмечена присуждением Нобелевских премий. У. Жильберт в 1977 году определил наличие экзонов и интронов, а Р. Робертс и П. Шарп в

1993 году разработали понятие сплайсинга. Сплайсинг представляет собой вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК. Этим был сделан важный шаг на пути коммерциализации молекулярной медицины. Возможность получать ДНК *in vitro* и производить белок соответствующими методами привело к развитию биотехнологической промышленности. Первая генно-инженерная компания Genentech inc. была образована в 1976 году в Калифорнии. Вслед за успешным лабораторным синтезом рекомбинантного гормона – фактора роста человека последовало промышленное производство человеческого инсулина, который был представлен этой компанией на рынок в 1982 году. В период 1980–1983 гг. в США было создано около 200 биотехнологических компаний, а к 1985 году уже более 400 фирм, включающих в свое название слово «ген» принадлежали к генно-инженерному цеху. Сейчас в США более 1500 таких компаний, в том числе такие гиганты, как Biogene, Amgene, Engenics и другие, а во все мире их более 3000. На рынке появились десятки биотехнологических препаратов, еще сотни проходят клинические испытания. Существуют компании, выпускающие полученные генно-инженерными методами антитела: ImmunoGen, Immunex и другие.

В течение 1980-х годов была разработана методика получения трансгенных мышей. Этим было положено начало новому этапу развития молекулярной медицины, свидетельствующему о таком накоплении теоретических представлений и экспериментальных данных, которое может позволить разработать соответствующие практические методы диагностики, профилактики и лечения заболеваний человека.

ГЕНЕТИКА, ГЕНОМИКА И ДРУГИЕ ОМИКСЫ

Омиксные технологии используются для изучения организма и его частей на самых разных уровнях, начиная с уровня ДНК. Благодаря омиксным технологиям можно обнаружить те или иные мутации в ДНК, выяснить, как они влияют на экспрессию генов и продукцию белков, а также как эти белки взаимодействуют между собой в клетке и организме в целом. Биомаркеры, полученные с помощью омиксных технологий, наряду с клинической и экологической информацией, расширяют возможности врачей и делают медицинскую помощь максимально индивидуализированной.

Генетика и геномика

В этой книге широко используются термины «генетика» и «геномика». Термины «генетика» и «геномика» часто используются как синонимы, хотя на самом деле они описывают совершенно разные подходы в биологии и медицине. Генетика – это исследование наследственности и генов, которые обеспечивают физическую, биологическую и концептуальную основу наследственности и изменчивости. Наследственность – это свойство живых существ передавать определенные черты, включая клинические признаки заболевания, из поколения в поколение. Болезнь, которая считается наследственной, безусловно генетически обусловлена, однако не все генетические заболевания являются наследственными (например, онкологические заболевания всегда являются генетически обусловленными, но только иногда наследственными заболеваниями).

Геномика – это исследование генома или геномов. Геном – полная последовательность ДНК, содержащая всю генетическую информацию биологического объекта или всей популяции в целом. Термин «геном» возник как аналог более раннего термина «хромосома», относящегося к физическим объектам (видимым под микроскопом), переносящим гены от одной клетки к дочерним клеткам или от одного поколения к другому. Геномика подразделя-



«Омиксные» технологии для персонализированной медицины.

ется на сравнительную – изучает в сравнении организацию и содержимое геномов различных живых организмов; функциональную геномику – изучает функции генов, а также способы воздействия на активность генов, и структурную геномику – изучает структуру генома с помощью молекулярного анализа.

Геном и синтез белка

Геном человека очень сложно организован и состоит из 46 хромосом, 2 из которых относятся к половым хромосомам X и Y. Женский фенотип состоит из XX хромосом, мужской – XY. Средняя хромосома содержит 2000–5000 генов, но только около 10% из них кодируют белки или функциональные РНК, остальные могут играть различные роли, например, регулирование экспрессии генов.

Ген представляет собой последовательность хромосомной ДНК, которая необходима для образования функционального продукта: полипептида или функциональной молекулы РНК. Гены варьируют в размерах от малого (1,5 тысяч пар оснований (п.о) для гена глобина) до большого (примерно 2400 тыс. п.о. для гена дистрофина). Ген включает в себя не только кодирующие последовательности, но и соседние нуклеотидные последовательно-

сти, необходимые для правильной экспрессии генов. Экспрессия гена означает, что его ДНК используется для производства определенного белка. Для производства белка вначале образуется матричная РНК (мРНК) – этот процесс называется транскрипцией. Зрелая мРНК составляет примерно 1/10 размера гена, из которого она транскрибируется.

Следующий этап – этап синтеза белка называется трансляцией. В результате экспрессии генов образуются белки, функция которых в клетке крайне разнообразна: строительная, ферментативная (каталитическая), регуляторная (гормоны), сократительная, сигнальная, энергетическая, защитная, рецепторная и др. Белки являются высокомолекулярными органическими соединениями, состоящими из аминокислот, соединенных друг с другом пептидной связью. В организме человека все белки состоят из 20 аминокислот. Последовательность соединения аминокислот определяется генетическим кодом. Различные последовательности аминокислот образуют множественные комбинации белков, обеспечивая таким образом биологическое разнообразие. Последовательность аминокислот в белке



Геном человека.
Состоит из 46 хромосом, 2 из которых относятся к половым хромосомам X и Y.

называют первичной структурой белковой молекулы, которая в дальнейшем упаковывается во вторичную, третичную и четвертичную структуры. Для выполнения своей функции аминокислотные остатки в составе белка часто подвергаются химическим (посттрансляционным) превращениям – фосфорилированию, метилированию, ацетилированию, присоединению коферментов, частичному протеолизу.

Помимо больших белковых молекул, важную роль в жизнедеятельности организмов играют многочисленные короткие фрагменты белковых предшественников, которые называются олигопептидами, или просто пептидами. Именно из-за них наблюдается такой разноразной в оценке количества белково-пептидных компонентов у представителей одного биологического вида.

Казалось бы, зная полный геном и генетический код, можно путем трансляции получить все сведения о структуре белков. Однако все не так просто. В клеточной системе организма нет корреляции между наборами мРНК и белков. Кроме того, многие белки, синтезированные на рибосомах в соответствии с нуклеотидной последовательностью, после синтеза подвергаются химическим превращениям и могут существовать в организме в модифицированной и немодифицированной формах. И еще немаловажно то, что белки обладают разнообразными пространственными структурами, которые на сегодняшний день нельзя определить по линейным последовательностям нуклеотидов и даже аминокислот. Поэтому прямое выделение и определение структуры всех функционирующих белков остается по-прежнему актуальной задачей (определение структуры на сегодняшний день осуществлено примерно для 10% белков человека).

Проект «Геном человека» обеспечил ученых информацией о генетической последовательности человека, благодаря которой началась дальнейшая работа по изучению того, как гены работают. Это помогает объяснить функцию и экспрессию генов, а также механизмы изменений в структуре ДНК. Изменения в структуре ДНК происходят постоянно – спонтанно или в результате действия определенных веществ (мутагенов), либо под воздействием радиации. Спонтанные мутации, в основном, возникают в результате ошибок при репликации (удвоении) ДНК, при неравном кроссинговере, неправильном расхождении хромосом в мейозе и др. Однако,



Международный научно-исследовательский проект «Геном человека» начат в 1990 году под руководством Дж. Уотсона.

в клетках существует защитный механизм, в результате которого происходит восстановление (репарация) поврежденных участков ДНК. Однако, если вследствие различных причин механизмы репарации нарушаются, то ошибки в ДНК будут оставаться и накапливаться. Такие стойкие изменения в геноме называются мутациями.

Мутации

Мутации могут быть разного уровня: геномные, хромосомные и генные.

Геномные мутации приводят к изменению числа хромосом. Возможно кратное увеличение числа хромосом в 2, 3, 4 и т.д. раз – полиплоидия и анеуплоидия – увеличение или уменьшение одной или двух хромосом. Полиплоидия часто встречается у растений. У человека чаще встречается анеуплоидия, которая приводит к серьезным аномалиям развития, часто несовместимыми с жизнью. Наиболее жизнеспособными являются следующие мутации – синдром Дауна (трисомия по 21-й хромосоме, т.е. у человека существуют три 21-х хромосомы), Синдром Патау (трисомия по 13-й хромосоме), Синдром Эдвардса (трисомия по 18-й хромосоме), синдром Шершевского-Тернера (моносомия половой X-хромосомы, т.е. отсутствует одна X-хромосома), Синдром Кляйнфельтера (трисомия по половой X-хромосоме у мужчин). Основная причина этих болезней – нерасхождение хромосом в мейозе у одного из родителей во время образования половых клеток.

При хромосомных мутациях происходят крупные перестройки структуры отдельных хромосом. В этом случае наблюдаются потеря (делеция) или удвоение части (дупликация) генетического материала одной или нескольких хромосом, изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах (инверсия), а также перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую (транслокация). Такие аномалии сопровождаются умственной отсталостью, задержкой роста и развития, часто наблюдаются характерные внешние проявления, врождённые пороки внутренних органов. У таких больных впоследствии выявляется бесплодие.

Например, синдром кошачьего крика связан с делецией короткого плеча 5-й хромосомы. Признаком его служит необычный плач детей, напоминающий мяуканье или крик кошки. Это связано с патологией гортани или голосовых связок. Наиболее типичным, помимо «кошачьего крика», является умственное и физическое недоразвитие, микроцефалия (аномально уменьшенная голова). При транслокации онкогена Bcl-2 с 18-й хромосомы на 14-ю происходит избыточный синтез этого белка и развивается В-клеточная лимфома.

Делеция на длинном плече 13-й хромосомы связана с развитием ретинобластомы, делеция в центральной области 15-й хромосомы приводит к развитию син-

*Мутации необходимы
для эволюции и селекции.
Мутации – источник болезней.*

дрома Прадера-Вилли, делеция в области короткого плеча 11-й хромосомы приводит к развитию нефробластомы, умственной отсталости, недоразвитию радужной оболочки глаза, половых желез. Делеция трех пар оснований в гене CFTR, ответственного за синтез белка, ответственного за транспорт ионов хлора через мембрану клетки, приводит к развитию муковисцидоза. Перечень таких заболеваний можно продолжить.

На геномном уровне изменения первичной структуры ДНК генов под действием мутаций менее значительны, чем при хромосомных мутациях, однако генные мутации встречаются чаще. В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена. В том случае, когда под действием мутации изменяется лишь один нуклеотид, говорят о точечных мутациях или однонуклеотидных полиморфизмах (SNPs – single nucleotide polymorphism). Эти участки ДНК характеризуют отличия генетического материала одного индивидуума от генетического материала другого. SNPs составляют около 90% всей генетической изменчивости человека. Образование SNP происходит с частотой примерно 1/500 пар оснований. Т.е. если в геноме примерно 3 миллиарда пар оснований, то количество SNPs составляет примерно 6 миллионов, а каждый из 25000 генов содержит примерно 5 кодирующих SNP. Идентификация SNPs важна, поскольку данная информация помогает в понимании генетической основы распространенных заболеваний человека, а также в оценке прогноза эффективности и побочных эффектов лечения. Более 10 миллионов SNPs уже находятся в общедоступных базах данных, однако только небольшая часть из них хорошо охарактеризована и подтверждена. В настоящее время удалось обнаружить SNPs, указывающих на высокую восприимчивость к раку легких, раку верхних дыхательных путей, колоректальному раку, раку молочной железы, в то же время достоверных маркеров предрасположенности не выявлено, и работа в этом направлении должна быть продолжена.

В последние годы уделяется внимание исследованию альтернативных форм естественной генетической изменчивости, таких как вариации числа копий в геноме человека (CNV, от англ. Copy number variation)

CNV – это явление, при котором разделы генома повторяются, а количество повторений в геноме варьирует между людьми в популяции человека. Примерно 5–10% генома человека можно классифицировать как CNV, которые у млекопитающих играют важную роль в создании необходимых вариаций в популяции, а также в фенотипе заболевания. В зависимости от числа копий CNV можно разделить на две основные группы: короткие повторы и длинные повторы. Однако между этими двумя группами нет четких границ, и классификация зависит от характера локусов. Короткие повторы включают, главным образом, бинуклеотид - повторы (два повторяющихся нуклеотида, например, A-C-A-C-C-A-C...) и тринуклеотидные повторы. Длинные повторы включают повторы целых генов. Эта класси-

фикация, основанная на размере повтора, является наиболее очевидным и понятным типом классификации, поскольку размер повтора является важным фактором в изучении механизмов, которые привели к повторению, и, наоборот, изучение вероятного влияния этих повторов на фенотип.

Одним из наиболее известных примеров коротких копий CNV является тринуклеотидный повтор пар оснований CAG в гене хантингтина, который отвечает за болезнь Хантингтона. Для развития болезни Хантингтона с высокой степенью вероятностью и передачи ее потомству количество повторов тринуклеотида CAG должно быть более 36 раз. Причина этих мутаций – ошибки в активности фермента ДНК-полимеразы во время репликации.

Крайне редко встречается повторение целого гена. Одним из примеров повторения целого гена является ген альфа-амилазы-1 (AMY1), который кодирует фермент альфа-амилазу слюны, расщепляющий крахмал на моносахариды. В зависимости от диеты количество копий фермента изменяется.

Сегодня считается, что CNV может играть более значимую роль в развитии заболеваний, чем это предполагалось ранее.

По патогенетическому механизму мутации могут быть разделены на 5 основных групп: 1) мутации, ведущие к потере функции белка (loss of function) – любые структурные повреждения генов (точковые мутации, делеции, экспансия тринуклеотидных повторов в некодирующих областях генов и т.д.), приводящие к ингибированию процессов транскрипции/трансляции или нарушению нормальной структуры и функции белка; 2) мутации, ведущие к появлению новой функции белка (gain-of-function). Этот тип мутаций характеризуется появлением новых свойств мутантного белка, которые оказывают повреждающее действие на жизнеспособность или функционирование экспрессирующих типов клеток; 3) мутации, обладающие доминантным негативным эффектом. Эффект таких мутаций проявляется в том случае, если продукт мутантного аллеля ингибирует функцию нормальных белковых молекул; 4) мутации, изменяющие «дозу гена». Такой эффект имеет место при делециях или дупликациях гена, что сопровождается нарушением нормальной цитоархитектоники молекулярного продукта; 5) мутации, обуславливающие количественные изменения соответствующих мРНК и белковых продуктов. Такой механизм наблюдается при локализации мутаций в регуляторных областях гена.

Основная классификация мутаций, применяемая для описания точковых структурных изменений, основана на характеристике типов структурных изменений в нуклеотидной последовательности ДНК и РНК. Выделяют следующие типы мутаций:

1. Нонсенс-мутация – изменение в нуклеотидной последовательности ДНК в кодирующей области гена, приводящее к возникновению терминирующего стоп-кодона и преждевременному прекращению синтеза белка;

2. Миссенс-мутация – изменение в нуклеотидной последовательности ДНК в кодирующей области гена, приводящее к замене одной аминокислоты на другую, что не нарушает процесс синтеза белка. Фенотипическое проявление таких замен зависит от природы соответствующих аминокислотных замен в белке и от функциональной значимости того домена, в котором произошло изменение;

3. Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания – возникают в результате вставки или делеции нескольких нуклеотидов (некратных трем), приводят к образованию бессмысленного белка, и/или к возникновению стоп-кодона на некотором расстоянии от самой мутации, что приводит к преждевременной терминации синтеза белка;

4. Мутации в сайтах сплайсинга – мутации на границе экзонов и интронов приводят к тому, что нарушается процессинг первичного РНК-транскрипта. В результате могут происходить: а) делеции всего или части экзона; б) обычно удаляемые интронные области могут стать смысловыми, что приводит к трансляция бессмысленно удлиненного белка, не защищенного от протеолитического действия внутриклеточных ферментов. Наиболее часто мутации затрагивают существенные динуклеотиды GT и AG, локализованные, соответственно, в начале интрона (донорный сайт сплайсинга) и в конце интрона (акцепторный сайт сплайсинга).

Эпигенетика и эпигеномика

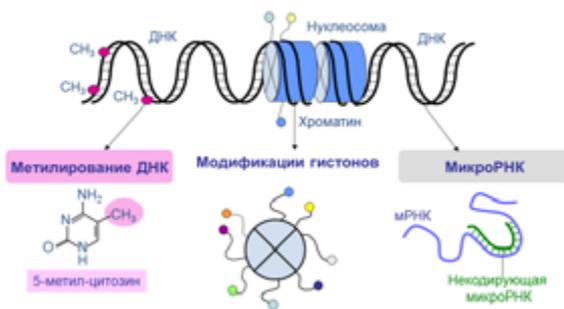
По аналогии с генетикой и геномикой возникло новое направление – эпигенетика и эпигеномика, изучающие факторы, влияющие на функции гена (или, более глобально, генома), но без сопутствующего изменения генов или генома. После открытия структуры ДНК в середине XX века долгое время считалось, что исключительно генетический код организма, то есть последовательность нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК, определяет закономерности функционирования составляющих ее генов и в широком смысле фенотип со всеми его признаками и проявлениями. Однако после успешного завершения в начале нынешнего тысячелетия грандиозного международного научно-исследовательского проекта «Геном человека» представления о функционировании генома претерпели существенные изменения. Вопреки ожиданиям оказалось, что вся информация о строении и функционировании человеческого организма заключена всего лишь в 25 тыс. генов, а не 100–150 тыс., как предполагалось ранее согласно общепринятой концепции «один ген – один белок». При этом собственно гены, кодирующие белки, составляют всего 1,5–2% от всей ДНК, а основная ее часть представлена некодирующими нуклеотидными последовательностями. Таким образом, «огромный симфонический оркестр генов, который надеялись обнаружить ученые, уменьшился до размеров струнного квартета». Расчеты показали, что геном человека содержит всего около

8–10 мегабайт информации, а это совершенно недостаточно для кодирования структуры, не говоря уже о функциях, только одного такого сложного органа, как головной мозг. Оставались без ответа и другие вопросы, неразрешимые с точки зрения общепринятой «центральной догмы молекулярной биологии», согласно которой все свойства организма определяются исключительно генетическим кодом и поток информации может идти только в одном направлении – от ДНК к белкам и опосредуемой ими функции, но никогда наоборот. Например, вопросы, связанные с механизмами клеточной дифференцировки, протекающей не только в эмбриогенезе, но и при некоторых нормальных физиологических процессах во взрослом организме (кровообразование, сперматогенез, регенерация). Почему клетки различных органов и тканей, имея полученный по наследству одинаковый набор хромосом, в процессе развития и функционирования экспрессируют различные гены и белки, определяющие их специализацию? Или почему генетически идентичные однояйцевые близнецы в течение жизни проявляют разную предрасположенность к болезням, в том числе и к тем, которые определяются генетическими факторами?

По мере накопления данных стало понятно, что, при безусловно главенствующей роли ДНК – базового носителя внутриклеточной информации, в функциональном смысле геном – это отнюдь не статичная, а чрезвычайно пластичная, «подвижная» структура, в которой, начиная со стадии морфогенеза у эмбриона и далее на протяжении всей жизни организма, уровень генной экспрессии постоянно меняется. Такая регуляция активности генов реализуется посредством эпигенетических модификаций. Суть этих модификаций заключается в энзиматическом ковалентном присоединении/диссоциации функциональных химических групп к определенным нуклеотидам ДНК, а также к аминокислотным остаткам белков-гистонов, входящих в состав хроматина. В результате этого подавляется или, наоборот, активируется экспрессия функционально важных генов и, соответственно, уменьшается или увеличивается выработка кодируемых ими белков. Самыми известными и наиболее изученными эпигенетическими модификациями являются метилирование ДНК и диацетилирование гистонов – механизмы, приводящие к ингибированию геномной экспрессии. ДНК – метилирование происходит по остатку цитозина под действием фермента ДНК-метилтрансферазы в строго определенных участках гена – так называемых динуклеотидных островках CpG, которые содержатся в промоторной области подавляющего большинства генов. Деацетилирование гистонов катализируется гистондеацетилазой. Третий базовый механизм эпигенетической регуляции реализуется посредством микроРНК – особого класса коротких (19–25 нуклеотидов) некодирующих одноцепочных молекул РНК, которых для человека сегодня известно около двух тысяч. Выключение гена при этом осуществляется путем предотвращения трансляции и синтеза функциональных белков в результате дефект-

ной комплементарности между микроРНК и мРНК или путем деградации мРНК при полной комплементарности микроРНК и мРНК. По разным оценкам мишенями микроРНК являются от 30 до 60% белоккодирующих генов человека. Важно подчеркнуть, что эпигенетические модификации, называемые также «эпимутациями», в отличие от истинных генетических мутаций, не затрагивают структуру ДНК и являются потенциально обратимыми, то есть могут регулироваться факторами внутренней и внешней среды, такими как возрастные изменения, связанные со старением организма, особенности питания (диета), стрессорные воздействия, хронические патологические процессы, лекарственная терапия и даже психоэмоциональные стимулы.

Научно доказано, что эпигенетические изменения, вызванные средовыми стрессовыми факторами, при определенных условиях способны не только сохраняться при последовательных митотических делениях клетки, но и передаваться трем-четырем следующим поколениям при мейозе. Хотя признанию этого факта предшествовал многолетний спор сторонников и противников эпигенетики, считавших подобный подход возвратом к идеям ламаркизма с его «наследованием благоприобретенных признаков» – как казалось до последнего времени, навсегда отвергнутой лженауки. Сегодня классическая геноцентрическая концепция радикально пересмотрена, и новая молодая научная дисциплина эпигенетика, допускающая возможность обратного направления потока информации от функции, находящейся под воздействием различных внешних и внутренних факторов, к соответствующему гену, по праву считается одной из самых изучаемых и перспективных в биологии. По значимости совершаемых в данной области открытий и масштабу разворачивающихся при этом перспектив как в фундаментальной науке, так и в практической медицине эпигенетика ставится в один ряд с такими эпохальными научными достижениями человечества в области естествознания как теория эволюции Дарвина, открытия Менделя и установление структуры ДНК. Становится очевидным, что эпигеном высокоразвитых многоклеточных организмов является полноценной «второй информационной системой», которая обеспечивает дополнительный мощный информационный ресурс для сложной многоуровневой регуляции их жизнеобеспечения и функционирования, а фенотип любого организма представляет собой



Механизмы эпигенетической регуляции.

Механизмы эпигенетической регуляции.

суммарную реализацию генома и эпигенома. Сегодня для млекопитающих и человека, кроме процесса метилирования ДНК, известно около десятка способов посттрансляционной модификации различных аминокислотных остатков в составе гистонов хроматина, т.н. «гистонового кода» (ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, АДФ-рибозилирование, биотинилирование, сумоилирование, изомеризация пролинового остатка и др.), и несколько тысяч молекул различных микроРНК. Поливариантные сочетания этих механизмов эпигенетической регуляции генной транскрипции создают поистине неограниченные возможности для расширения внутриклеточного информационного пула.

Доказано, что нарушение метилирования ДНК и других эпигенетических сигналов приводят к преждевременному старению и таким заболеваниям как диабет, астма, псориаз, тяжелые психические расстройства (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, аутизм, шизофрения), сердечно-сосудистые и инфекционные заболевания. Известно, что грибы, вирусы и другие инфекционные агенты путем модуляции метилирования ДНК способны переключать программу работы генов хозяина в свою пользу.

Особенно активно изучается роль эпигенетики в инициации и прогрессии злокачественных опухолей, что привело к формированию отдельного самостоятельного научного направления – эпигенетики рака

Транскриптомика

Если период 1990–2000 гг. называют геномным десятилетием, то период 2000–2010 гг. – это период постгеномного десятилетия. Геномика породила ряд других «омиксов», которые относятся к комплексному исследованию полного набора геномных продуктов – например, белков (следовательно, протеомика), транскриптов (транскриптомика) или метаболитов (метабономика).

Транскриптом является исходным продуктом экспрессии генома. Он состоит из набора всех молекул РНК, существующих в одной клетке или ткани, в том числе кодирующих белки матричных РНК (мРНК) и некодирующих РНК, таких как рибосомная РНК (рРНК), транспортная РНК (тРНК), микроРНК (miRNA), малая интерферирующая РНК (siRNA), длинная некодирующая РНК (lncRNA), РНК-связывающие белки (RBPs) и многих других. В отличие от генома, который во всех клетках организма одинаков, транскриптом зависит от типа клеток, этапа развития и физиологического или патологического состояний. Поэтому состав транскриптома постоянно меняется и отражает профиль экспрессии генов в данный момент времени. Эти изменения транскриптомов могут быть исследованы с помощью различных методов, таких как количественная ПЦР с обратной транскриптазной реакцией (RT-qPCR), анализ экспрессии генов (SAGE/

CAGE), микрочипы ДНК или технологии секвенирования РНК (RNA-seq). В последнее время два последних метода играют ключевую роль в анализе экспрессии генов.

Главная задача транскриптомики – выяснение механизмов регуляции экспрессии генов. Благодаря тому, что биосинтез белка является ресурсо- и энергопотребляющим процессом, информационный поток от генов к белкам подвергается сложной системе регуляции. Каждый шаг экспрессии генов точно регулируется, начиная с контроля транскрипции – образования мРНК и времени ее жизни. Сегодня благодаря появлению и совершенствованию методов транскриптомики получен огромный массив данных о закономерностях контроля экспрессии генов. Получена масштабная информация о тканеспецифичных уровнях экспрессии всех генов во всех тканях человека и других животных и о влиянии различных факторов на активность генома. Решение этой задачи транскриптомики перекрещивается с задачами функциональной геномики – это определение условий транскрипции мРНК, роль промоторов, сайленсеров, энхансеров в этом процессе, особенности работы РНК-полимеразы и др. механизмов.

Следующий этап транскрипции – этап сплайсинга. Далее идет этап пост-транскрипционных процессов: взаимодействие с микроRNA, редактирование, транспорт в цитоплазму и т.д.

МикроРНК – это одноцепочечная некодирующаяся молекула РНК, имеющая длину 21–23 нуклеотида. Участок ДНК, кодирующий микроРНК, в большинстве случаев находится между белок-кодирующими генами и имеет самокомплементарный участок, который формирует шпильку на транскрибированной РНК. В ядре эта шпилька отрезается при помощи ферментного комплекса и переносится в цитоплазму. Там с помощью различных белков двухцепочечная шпилька разделяется, «пассажирская» цепь деградирует, а «ведущая» и получила название микроРНК. МикроРНК комплементарно связывается с участками мРНК, что приводит к разрушению мРНК и прекращению экспрессии белка.

Сама по себе микроРНК может являться биомаркером патологии кардиомиоцитов и эндотелия, развития фиброза, нарушения ангиогенеза, ишемии миокарда.

Согласно базе данных «miRBase» для человека на сегодняшний день известно более 2,5 тысяч микроРНК. МикроРНК играет важную роль в диагностике и определении эффективности лечения рака молочной железы и яичников. Повышение уровня miRNA-21, miRNA-34a, miRNA-214, miRNA-1346 является биомаркером рака молочной железы, а биомаркером рака яичников – усиление экспрессии miRNA-141, miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-3613.

Таким образом, собственные задачи транскриптомики состоят в выявлении и изучении не зависящих от геномных сигналов факторов, влияющих

на формирование структуры и динамики транскриптома и, в конечном счете, протеома. Для решения задач транскриптомики активно применяются методы биоинформатики.

Протеомика

Протеомика – анализ структуры и функции всех белков клетки, ткани или организма. Термин протеомика был предложен в 1997 году по аналогии с геномикой. Протеомика неразрывно связана с генетической информацией, т.к. количественная и качественная характеристика протеома клетки зависит от активности генома. В то же время набор белков клетки зависит от различных условий и воздействий, которым подвергаются клетка или организм. В связи с этим изучение протеома намного сложнее, чем генома. Кроме того, объем исследований протеома достаточно большой. Как уже упоминалось, в клетке около 25000 генов. Предположим, что все эти гены экспрессируются. Один ген может образовывать несколько белков, что увеличивает количество возможных белков. Учитывая сложный процесс образования функционально активных белков, например, превращение белка-предшественника в зрелую форму, или химическая модификация белков – фосфорилирование, гликозилирование, метилирование и ацетилирование. Один белок может иметь несколько потенциальных сайтов модификации, соответственно образуется несколько изоформ белка. В итоге количество белков к организму человека возрастает в несколько сотен раз. По предварительным оценкам человеческий протеом может состоять из 1 млн белков.

Протеомные подходы для обнаружения биомаркеров использовались при многих заболеваниях. Протеомика является ключевой технологией для открытия биомаркеров для фармацевтических и диагностических исследований. Несмотря на то, что синтез белка является результатом экспрессии генов, на этом пути имеется много важных этапов, воздействие на которые может изменять белковый профиль клетки. Это время жизни мРНК, посттрансляционная модификация белка, транспорт и экскреция белка. Поэтому количественная протеомика помогает в дифференциальной диагностике, а также обеспечивает понимание патогенеза заболевания и позволит оценить результаты лечения.

Первое решение, которое необходимо принять при поиске биомаркера на основе протеомных технологий, состоит в том, какую ткань необходимо исследовать. Жидкости тела имеют преимущество, т.к. они легко доступны и неинвазивны (моча) или малоинвазивны (кровь, спинномозговая жидкость). Идентификация редких белков в крови часто затруднена из-за большой концентрации таких белков как альбумин и иммуноглобулины. Решением этой проблемы является специфическое удаление с помощью иммуноаффинной колонки 6 самых многочисленных белков сыворотки

крови. В результате этого удаляется около 85% белковой массы. Благодаря этому можно организовать работу с остальными белками сыворотки крови. Сегодня идентифицировано только около 500 из 30 000 белков сыворотки. Задача стоит не только в количественной идентификации, но и выявлении структурных изменений белков. Достижения в протеомике вселяют надежду на открытие биомаркеров, которые могли бы служить основой для новых клинических лабораторных исследований.

Исследование биомаркеров оказалось перспективным для диагностики и оценки эффективности лечения онкологических заболеваний и заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Вследствие гетерогенности злокачественных новообразований существует множество протеомных биомаркеров опухолевой болезни. На данный момент ключевыми биомаркерами опухолей являются молекулы, приведенные в таблице.

Помимо вышеперечисленных маркеров важную роль в диагностике новообразований играет семейство белков-регуляторов апоптоза Bcl-2. Внутри семейства есть как ингибиторы апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 и Mcl-1), так и белки, выполняющие проапоптотическую функцию (Bim, Bid, Bad, Noxa и Puma).

Ключевые биомаркеры опухолей

Тип опухоли или её локализация	Биомаркер	
Опухоли молочной железы	ER	Эстрогеновый рецептор (от англ. Estrogen receptor)
	PR	Рецептор прогестерона (от англ. Progesterone receptor)
	HER-2	Второй рецептор фактора роста эпидермиса (от англ. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
Колоректальная карцинома	EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста (от англ. Epidermal Growth Factor Receptor)
	KRAS	Представитель семейства онкогенов Ras
	UGT1A1	Уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза (УДФ-глюкуронозилтрансфераза)
Опухоли желудка	HER-2	Второй рецептор фактора роста эпидермиса (от англ. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
	GIST	Гастроинтестинальные стромальные опухоли (от англ. Gastrointestinal Stromal Tumors)
	c-KIT	Рецептор тирозинкиназы (CD117)
Опухоли головы и шеи	p53	Фактор транскрипции клеточного цикла
	LOH	Потеря гетерозиготности (от англ. loss of heterozygosity)

Лейкемия и лимфома	CD20, CD30	кластеры дифференцировки (от англ. clusters of differentiation)
	FIP1L1-PDGFR	Химерный ген, образованный в результате слияния частей генов FIP1L1 (FIP1 like 1) и PDGFRA в результате перестройки 4-й хромосомы, кодирующий избыточно активную тирозинкиназу
	PDGFR	Рецептор тромбоцитарного фактора роста (от англ. Platelet-derived growth factor receptors)
	BCR/ABL	Химерный ген, образованный двумя генами BCR и ABL в результате обмена генетическим материалом между 22-й и 9-й хромосомами – реципрокной транслокации, кодирующий избыточно активную тирозинкиназу
	PML/RAR α	Химерный ген, образованный путем слияния частей генов PML и RAR α в результате обмена участками между 15-й и 17-й хромосомами. Образуется белок с измененными свойствами нормального белка RAR α -рецептора ретиноевой кислоты в ядре клетки
	TPMT	Тиопурин метилтрансфераза (от англ. Thiopurine methyltransferase)
	UGT1A1	Уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза (УДФ-глюкуронозилтрансфераза)
Опухоли печени	AFP	Альфа-фетопротейн (от англ. Alpha-Fetoprotein)
	AFPL1	Изоформа альфа-фетопротейна, способная реагировать с агглютинином лектина
	DCP	Дез- γ -карбоксипротромбин (от англ. Des-gamma-carboxyprotrombin)
Опухоли поджелудочной железы	CA19-9	Высокомолекулярный гликопротеин (от англ. Carbohydrate antigen)
Опухоли лёгких	ALK	Анапластическая киназа лимфомы (от англ. Anaplastic lymphoma kinase)
	EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста (от англ. Epidermal Growth Factor Receptor)
	KRAS	Представитель семейства онкогенов Ras
Меланома	BRAF	Протоонкоген, кодирующий белок B-Raf
Опухоли эндометрия и шейки матки	HPV	Вирус папилломы человека (от англ. Human papilloma virus)

В области протеомики заболеваний сердечно-сосудистой системы обнаружено более 100 кардиоспецифических белков, уровни которых значительно изменяются при коронарогенной патологии. Согласно предварительным данным наиболее многообещающими биомаркерами в

кардиопротеомике могут служить тропонины, α 1-фибриноген, аполипопротеин A1 и С-реактивный белок.

Тропонины – биомаркеры миокардиального стресса. Исследование их уровня используется для диагностики инфаркта миокарда.

Аполипопротеин A1 – основной белок липопротеинов высокой плотности, который участвует в транспортировке триглицеридов и обратном транспорте холестерина в печень. Пониженный уровень аполипопротеина A1 является биомаркером атеросклероза и дислипидемии и циррозе печени.

С-реактивный белок является биомаркером воспаления при заболеваниях, связанных с атеротромботическими событиями. Он обнаруживается в атероме, бляшках и местах повреждений сосудов. С-реактивный белок принимает участие в образовании тромбов в артериях, что при прогрессировании данной патологии приводит к инсульту и инфаркту миокарда.

Помимо исследований биомаркеров в крови, в последние годы все большую популярность приобретает саливадиагностика (выявление биомаркеров в слюне). Основным преимуществом саливадиагностики является неинвазивность этого метода. Возможно многократное получение слюны для отслеживания временной динамики показателей. Полученный материал не требует специальных условий обработки для хранения. В слюне человека обнаружены факторы роста гепатоцитов, фибробластов, нейронов, эпителиоцитов, тимоцитов, инсулиноцитов, эндотелиоцитов, которые синтезируются клетками стрийных протоков слюнных желез. Так же в слюне идентифицированы молекулы, связанные с патологией сердечно-сосудистой системы, онкологическими и метаболическими заболеваниями.

Таким образом, знание о том, какие белки существуют в здоровых и больных тканях, позволило бы определить, какие гены необходимы для нормального функционирования организма. Эта информация поможет в разработке новых диагностических тестов при различных заболеваниях, а также позволит разработать новые лекарственные препараты, влияющие на активность поврежденных генов или белков.

Понимание этих вопросов откроет новый этап в молекулярной диагностике, генной терапии и других областях биомедицины.

Метаболомика

Метаболомика – это наука, изучающая метаболом клетки или организма, представленный набором низкомолекулярных метаболитов, которые могут быть обнаружены как в биологическом образце, так и в организме. Метаболиты – это промежуточные и конечные продукты обмена веществ. В метаболомике метаболиты обычно определяют как любые молекулы размером не более 1 КДа. Однако существуют и исключения из этого правила. Это зависит от конкретного образца и аналитического метода. На-

пример, такие макромолекулы, как липопротеины и альбумин, надежно определяются при анализе плазмы крови методом ЯМР-спектроскопии. В метаболомике человека принято делить метаболиты на эндогенные (произведенные изучаемым организмом) и экзогенные. Метаболом формируется большой сетью метаболических реакций, где продукты одной ферментативной реакции являются исходными веществами для другой.

Термин «метабономика» построен по аналогии с транскриптомикой и протеомикой. Так же как транскриптом и протеом, метаболом постоянно меняется. Хотя метаболом может быть определен сравнительно легко, в настоящее время не представляется возможным определение широкого спектра метаболитов с помощью одного аналитического метода. В январе 2007 года учёные университета Альберта и университета Калгари закончили создание первой версии метаболома человека. Они каталогизировали около 2500 метаболитов, 1200 лекарств и 3500 компонентов пищи, которые могут быть найдены в человеческом организме. Эта информация, доступная в базе данных метаболома человека (www.hmdb.ca) и основанная на анализе существующей научной литературы, далеко не полная. Анализ метаболомного профиля крови, позволяющий одновременно получить информацию о сотнях и тысячах метаболитов, уже сейчас показывает значимые результаты в решении большого количества научных и клинических задач.

Фармакогеномика и фармакопротеомика

Два этих термина, имеющих отношение к разработке и применению лекарственных средств, основаны на взаимосвязи генетического полиморфизма и эффективности лекарственных средств. Фармакогеномика изучает генетически запрограммированную реакцию людей на лекарственные препараты. Концептуальную основу фармакогеномики составляют представления о генетическом полиморфизме. Фармакопротеомика – это применение протеомики при разработке новых лекарств, её можно рассматривать как расширение фармакогеномики. Индивидуальный ответ на лекарственные препараты зависит от фармакокинетики и фармакодинамики заданного лекарственного средства у конкретного человека.

Фармакокинетика определяется всасыванием, транспортировкой, метаболизмом и выведением из организма. В свою очередь, фармакодинамика лекарственного препарата зависит от различиях в белковых мишенях препарата, например, рецепторах, ферментах или ионных каналах. От того, как протекают эти процессы у конкретного человека, и зависит эффективность и токсичность лекарственного препарата. Т.е. можно сказать, что фармакокинетика и фармакодинамика генетически детерминированы.

В развитии фармакокинетических событий большое значение имеет фермент цитохром P450, участвующий в метаболизме гидрофобных (не растворимых в воде) лекарственных средств. Это большое семейство изо-

ферментов, белки которого закодированы отдельными генами CYP. Хорошо изучены шесть генов – CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4, которые значимы с фармакогенетической точки зрения. Ферменты, кодируемые этими генами, отвечают за первую фазу трансформации 90% широко распространенных лекарств. Например, CYP2D6 отвечает за биотрансформацию более 70 различных лекарственных препаратов, а CYP3A4 метаболизирует более 40% всех лекарств, используемых в клинической медицине.

Вторая фаза биотрансформации лекарств зависит от активности ферментов, осуществляющих конъюгацию с рядом веществ (присоединение глюкуроновой кислоты, глутатиона, остатка уксусной кислоты и сульфатной группы), так что лекарственные вещества становятся водорастворимыми. Большинство ферментов, осуществляющих эти реакции, хорошо описаны и играют важную роль в фармакокинетике лекарственных средств.

Ферменты, обеспечивающие фармакокинетические функции всасывания, распределения и выведения из организма лекарственных средств, называют «транспортёрами лекарств». К ним относятся гликопротеин P, транспортёры органических анионов и катионов и др. Наибольший интерес с фармакогенетической точки зрения представляет собой полиморфизм гена MDR1, кодирующий гликопротеин P. Этот фермент контролирует выброс различных ксенобиотиков из клетки, препятствует всасыванию лекарственных средств из кишечника. Субстратами гликопротеина P являются сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, макролиды, цитостатики, противовирусные препараты. Несколько полиморфизмов гена MDR1 подробно изучены, разработаны клинические рекомендации по назначению ряда лекарственных препаратов в зависимости от индивидуальных генетических особенностей.

Фармакогеномика позволяет увеличить эффективность применения лекарств и свести побочные эффекты к неизбежному минимуму. В прошлом врачи обращали внимание на негенетические факторы, такие как возраст, питание, сопутствующие заболевания. В настоящее время признано, что большую роль в ответе на терапию играет генетическая предрасположенность. Генетические мутации способствуют изменению структуры ферментов и рецепторов. Следовательно, изменяется метаболическая активность ферментов и сродство рецепторов к препаратам. Фармакогенетические исследования показали свою эффективность при атеросклерозе, хронической обструктивной болезни легких, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, нейropsихиатрических и онкологических заболеваниях. Так как при онкологических заболеваниях ответ на терапию зависит не только от генотипа индивида, но и от генотипа опухоли, то изучение фармакогеномики опухолей является важной задачей персонализированной медицины. В России в клинической практике в настоящее время

в качестве фармакогенетических тестов используются оценка чувствительности к варфарину и резистентности к клопидогрелу.

Тест на чувствительность к варфарину используется для подбора начальных доз варфарина пациентам с различными видами тромбозов или тромботических осложнений. Согласно результатам данного теста, разброс дозировок варфарина составляет от 0,7 до 9,8 мг/сут. Благодаря применению теста уменьшается срок подбора препарата, что приводит к снижению кровотечений в 4,5 раза. По данным литературы около четверти пациентов являются носителями генотипа CYP2C19, ассоциированных с отсутствием антиагрегантного эффекта клопидогрела, и, следовательно, им необходимо подобрать другой препарат.

Кроме того, фармакогеномика исследует как изменяется экспрессия генов при действии лекарственных препаратов. В 2016 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) было одобрено 33 фармакогеномных биомаркера в рекомендациях для оценки эффективности и безопасности лекарственных средств.

В клинике результатом фармакогеномных исследований является внесение геномных данных в инструкцию к лекарственному препарату. Выявление геномной вариабельности для прогнозирования ответа организма пациента на определенный лекарственный препарат сосредоточено преимущественно на вариациях генного кодирования: ферментов, метаболизирующих лекарства, переносчиков лекарств и мишеней их действия. Для предсказания побочных реакций на определенные лекарственные препараты важную роль также играют анализы гаплотипов HLA.

К 2015 г. 176 описаний лекарств, одобренных FDA, содержат фармакогеномную информацию. Фармакогеномная метка (pharmacogenomics label) показывает насколько информативным является прогностическое генотипирование ДНК пациента: обязательным, настоятельно рекомендуемым или информативным. Фармакогеномные метки имеют большое значение при лечении онкологических заболеваний, так как изменение в геноме опухоли может определять эффективность применяемого лечения.

Тиопурин S-метилтрансфераза (TPMT) является ферментом, ответственным за инактивацию меркаптопурина посредством S-метилирования, который используется при лечении острой лимфобластной лейкемии у детей. Полиморфизм гена, кодирующего этот фермент, ответственен за снижение его активности, что затрудняет назначение безопасной дозы этого препарата. У детей, больных лейкемией и имеющих наследственный дефицит TPMT, лечение меркаптопурином может оказывать токсическое действие на костный мозг. Таким образом, относительно редкий полиморфизм TPMT очень важен с клинической точки зрения.

Изучение полиморфизма в генах, кодирующих белки-мишени для лекарственных средств, актуально на сегодняшний день. Благодаря изученным генетическим полиморфизмам ряда лекарственных мишеней, объясним

Медицина будущего.

Персонализированная медицина: опыт прошлого, реалии завтрашнего дня

их различный фармакологический ответ. Сегодня уже есть информация о ряде полиморфизмов, например, в генах ангиотензиногена, рецептора ангиотензина II 1-го типа, аполипопротеина E, V фактора Лейдена, гликопротеина IIIa, β 2-адренорецептора, β 2-брадикининовых рецепторов и др. Сведения об этих генетических полиморфизмах уже применяются в клинической практике.

ГЕНОМНАЯ МЕДИЦИНА

Медицинская генетика – это использование генетики в медицине с особым вниманием к наследственным заболеваниям. Медицинская генетика включает клиническую генетику, биохимическую генетику, цитогенетику, молекулярную генетику, генетику распространенных заболеваний и генетическое консультирование. Медицинская генетика является самостоятельной дисциплиной. Геномная медицина – это термин, который иногда используется в клинической медицине и может иметь отношение к различным медицинским дисциплинам (если не ко всем), не ограничиваясь только медицинской генетикой и, таким образом, имеет более широкую точку приложения.

И медицинская генетика, и геномная медицина оказывают влияние на лечебные мероприятия, главным образом, через изучение индивидуальных генов и их влияния на пациентов и их семью. В то же время геномная медицина относится к крупномасштабным исследованиям, оценивающим в полном объеме геном, протеом, транскриптом, метаболом и/или эпигеном при принятии решений в клинике.

Принципы и подходы геномной медицины выходят далеко за рамки традиционной медицинской генетики и включают в качестве маркеров оценку предрасположенности к болезням, профилирование экспрессии генов для характеристики опухоли или определения прогноза при онкологических заболеваниях, для уточнения дозировки лекарственных веществ у конкретного больного. Эти подходы лежат в основе персонализированной медицины, которая относится к быстро развивающейся области здравоохранения благодаря уникальной клинической, геномной и экологической информации.

Укрепление здоровья и профилактика заболеваний – основная задача специалистов общественного здравоохранения. Тем не менее современные подходы к здравоохранению до сих пор не учитывают генетические факторы в качестве рисков и причин развития заболеваний. До сих пор рекомендации по образу жизни, физической активности и питанию были разработаны в общем виде. В свете новых персонализированных подходов с использованием биомаркеров как предикторов заболевания существует возможность оптимизации профилактической стратегии здравоохранения.

Генная терапия

Медицина будущего не может быть полной без упоминания исследований недавних лет в области профилактики и терапии наследственных, инфекционных и соматических заболеваний с использованием методов генной терапии.

Генная терапия представляет собой отрасль молекулярной медицины, основанную на введении в клетку генетического материала с целью ис-

правления генных дефектов, придания клеткам функций, прежде им не свойственных, или предотвращения заболеваний, вызываемых этими дефектами. Для достижения этой цели необходимо понимание генетической природы явления и разработка адекватного терапевтического воздействия.

В роли лекарственного средства при генной терапии выступает клонированный ген или искусственно синтезированные молекулы РНК или ДНК. Первый этап развития генной терапии (1970–1990-е годы) – период надежд – ознаменован большим количеством экспериментальных работ в этой области. Предполагалось, что основной вклад эта отрасль сможет внести в лечение наследственных заболеваний, связанных с моногенными дефектами. Однако экспериментальные исследования показали, что при работе на уровне зародышевых и половых клеток существует риск развития серьезных последствий для генофонда отдельного человека, поэтому задача лечения наследственных заболеваний не может быть решена заменой «дефектного» гена на полноценный. С другой стороны, эти исследования послужили толчком для развития комплементарной генной терапии – когда в организм больного вводится полноценно работающий ген. Кроме того, было обнаружено, что многие широко распространенные заболевания, в том числе сердечно-сосудистые и инфекционные, имеют в своей основе генетическую составляющую, а значит могут быть скорректированы и даже излечены при помощи методов генной терапии.

Первое успешное применение методов генной терапии в начале 1990-х годов считается началом следующего этапа в истории генной медицины. После разработки новых средств доставки генетического материала в клетку начались массовые клинические исследования в области генной терапии. Были предприняты попытки лечения семейной гиперхолестеринемии, гемофилии В, муковисцидоза и глиобластомы. Однако в то же время стали накапливаться и отрицательные результаты геннотерапевтического воздействия. Так, при проведении первой фазы клинических исследований в результате введения рекомбинантного аденовирусного вектора погиб 18-летний пациент. Его смерть наступила в связи с развитием дыхательной недостаточности, отказом почек и ишемией коры головного мозга в ответ на введение генетической конструкции. В связи с этим были разработаны более жесткие требования к проведению клинических исследований в области генной терапии.

В настоящее время определились основные группы заболеваний, при лечении которых возможно применение генной терапии. В первую очередь, это онкологические заболевания (более 65% проводимых клинических исследований). Исследования, посвященные моногенным заболеваниям, составляют 8,2%, а патологии сердечно-сосудистой системы – 9,3%. Около 7,6% исследований касаются лечения и профилактики инфекционных заболеваний, в том числе СПИДа, гепатита В, а также создания нового поколения вакцин.

Стандартная схема генокоррекции включает ряд последовательных этапов. На первом этапе создается полноценно работающая (экспрессирующаяся) генетическая конструкция, содержащая смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена, которую размножают клонированием в бактериях. Далее осуществляют подбор вектора, который должен обеспечить эффективную доставку гена в клетки-мишени, встраивание гена в векторную систему с последующим переносом полученной конструкции (трансфекцией) в эти клетки.

Перенос гена в ядро клетки-мишени с дальнейшей его экспрессией приводит к изменению ее функционального статуса. Стабильность экзогенного генетического материала зависит от способа доставки. В зависимости от типа выбранного вектора ген может быть интегрирован в геном клетки-мишени, локализован в ядре в качестве искусственной мини-хромосомы или, как эписомальный элемент, в ядре или вне его. При подборе вектора необходимо учитывать желаемую продолжительность экспрессии трансгена, способность клеток к делению, тип клеток-мишеней, емкость трансгенной кассеты, вероятную иммуногенность вектора, легкость его конструирования, возможность введения дополнительного вектора, необходимость адекватного подбора регуляторных компонентов и обеспечение биобезопасности.

Чаще всего в качестве векторов используют ретровирусы (онкоретровирусы и лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и вирус простого герпеса. Способность генно-инженерных конструкций на основе вирусных векторов проникать в клетки-мишени (тропизм) определяется белками оболочки вируса, взаимодействующими с рецепторами, экспрессируемыми на поверхности клетки.

Хотя вирусные векторы обеспечивают высокоэффективный перенос генов и способны специфически интегрироваться в геном определенных типов клеток, они имеют ряд недостатков: часто иммуногены; при определенных обстоятельствах возможна их конверсия в репликационно компетентные вирусы; для большинства из них ограничена возможность встраивания протяженных генетических конструкций.

Доставка генов с помощью невирусных векторов кажется привлекательной по ряду причин. Их использование исключает опасности, связанные с применением вирусных векторов. Эти векторы способны переносить большие фрагменты ДНК (до 650 т.п.н.).

При конструировании невирусных векторов используют терапевтический ген, встроенный в плазмиду, представляющую собой протяженную нестабильную молекулу ДНК. Для успешной доставки плазмиды в клетку-мишень через плазматическую и ядерную мембраны необходима защита ДНК от механического и энзиматического разрушения с обеспечением долговременной экспрессии трансгена в клетках-мишенях. Наиболее распространенными невирусными векторами для переноса гена являются

катионные липидсвязанные комплексы с ДНК в составе липосом, полиплексов (комплексы с катионным полипептидом – лигандом, обеспечивающим связывание с клеткой и эндоцитоз), а также специальным агентом, облегчающим диссоциацию ДНК из этого комплекса и эндосом в цитоплазме (эндосомолитические агенты). Недостатками большинства систем невирусной доставки генетического материала является их малая эффективность.

Разработке программы генной терапии предшествует тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. В настоящее время с точки зрения перспективности генной терапии наибольшее внимание привлекает избирательная продукция следующих целевых белков: различных клеточных антигенов (21% всех клинических исследований); цитокинов (18%); опухолевых супрессоров (11,4%).

Высокая устойчивость опухолевых клеток к различным комбинациям химиотерапевтических препаратов вынуждает искать новые способы терапевтического воздействия. В этом направлении наиболее интенсивно развиваются исследования, касающиеся создания таких методов генотерапии, которые направлены на регуляцию апоптоза опухолевых клеток. В различных исследованиях доказана перспективность использования генно-терапевтических подходов относительно других апоптоз-специфических белков (BCL-2, p53 и др.). Использование этих генов имеет хорошие перспективы.

Перспективы использования генной терапии в лечении онкологических заболеваний обусловлены тем, что, во-первых, развитие ряда опухолей связано с вирусами, поэтому подходы, разработанные для лечения инфекционных заболеваний, в этом случае могут быть успешно применены. Во-вторых, большое количество данных, полученных при изучении структуры опухолевой клетки и ее функционирования, могут быть применены с использованием методов генной терапии для лечения опухолевых заболеваний.

Для лечения онкологических заболеваний с использованием генной терапии *ex vivo* опухолевые клетки больного культивируют в присутствии вектора, содержащего ген, кодирующий продукцию какого-либо цитокина (например, интерлейкина), ко-фактора или токсического продукта.

Затем клетки, подвергшиеся трансфекции, культивируют для увеличения их количества, а затем подвергают радиоактивному облучению, после чего они теряют способность к делению и распространению в организме. Затем эти клетки вводят больному, в результате чего активируется иммунная система, распознающая белок, продуцируемый трансфицированными клетками. В результате происходит уничтожение как опухолевых клеток, продуцирующих этот белок, так и клеток всей опухоли.

При введении вектора, содержащего ген, кодирующий белок, непосредственно в опухоль развивается иммунная реакция и происходит уничтожение клетки, продуцирующей белок.

В ряде случаев вектор, содержащий клонированный ген, вводят непосредственно в кровь больного. В этом случае вирусы проникают в клетки-мишени и интегрируются в геном клетки, после чего начинается продукция терапевтического белка.

Кроме того, проводятся активные клинические исследования в области генной терапии с использованием аутологичных клеток. Наиболее перспективны в этом отношении антиген-презентирующие клетки, которые в условиях *in vitro* трансфецируются вектором для борьбы с опухолевыми клетками, а затем вводятся больному. В настоящее время в США проводится несколько пилотных исследований по лечению онкологических заболеваний с помощью дендритных клеток, модифицированных фактором некроза опухоли, интерлейкином-12, а также меланома-специфическим антигеном.

Таким образом, для лечения злокачественных опухолей человека генная терапия предоставляет новые перспективные возможности, связанные с вмешательством в процессы роста и регуляции метаболизма опухолевых клеток. Создание эффективных и безопасных геннотерапевтических препаратов – задача ближайшего времени.

Редактирование генома

Редактирование генома является одним из видов генной инженерии. При этом может быть проведено включение, удаление или перемещение фрагментов ДНК в геноме с использованием специфически спроектированных эндонуклеаз, или «молекулярных ножниц». Эти нуклеазы создают сайт-специфичные двухцепочечные разрывы в ДНК в определённом участке генома. Индуцированные двухцепочечные разрывы репарируются в процессе рекомбинации, что позволяет получать направленные мутации.

Используются 4 типа нуклеаз: мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (*zinc fingers*), нуклеазы TALEN и система CRISPR-Cas9. Редактирование генома было признано методом года в 2011 году. Наиболее эффективным методом редактирования генома на сегодняшний момент времени является система CRISPR-Cas.

CRISPR (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – кластеры регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов) – это специализированные участки ДНК, состоящие из повторяющихся последовательностей, разделённых уникальными последовательностями – спейсерами. Повторяющиеся последовательности нуклеотидов – структурные блоки ДНК – распространяются по всей области

CRISPR. CRISPR-системы широко распространены среди прокариот: они обнаружены у 87% архей и 48% эубактерий.

Система CRISPR-Cas9 состоит из двух ключевых молекул, которые вводят изменение (мутацию) в ДНК. Это:

- **Фермент «Cas9».** Данная молекула CRISPR действует как пара «молекулярных ножниц». Cas9 может вырезать нити ДНК в определенном месте в геноме, чтобы затем можно было добавить или удалить фрагменты ДНК.

- **Часть РНК, называемая «гРНК» (гидовая РНК).** гРНК состоит из небольшого фрагмента предварительно разработанной последовательности РНК (длиной около 20 оснований), расположенного в более длинном участке ДНК. Этот участок связывается с ДНК и РНК для «направления» Cas9 в правую часть генома.

Система CRISPR-Cas9 позволяет разрезать цепь ДНК в одном строго определенном месте. Репарация («ремонт») ДНК в месте разреза может происходить по пути негомологичного соединения концов, в результате чего с большой частотой возникают мутации. Если же в клетку доставить искусственно синтезированную донорскую молекулу, которая гомологична участку разрыва, то таким образом можно произвести либо замену участка гена, либо направленную вставку трансгена. Система CRISPR может быть использована для получения как генетически модифицированных клеток, выращиваемых в культуре, так и живых организмов. В первом случае в клетки вводят плазмиды или вирусные векторы, которые обеспечивают высокий и устойчивый синтез элементов системы CRISPR-Cas9. Во втором случае в одноклеточные эмбрионы животных путем микроинъекции вводят уже «готовые» crRNA и мРНК, с которой происходит синтез белка Cas9. Для получения генетически модифицированных растений, клетки которых имеют прочную оболочку, используют выращиваемые в культуре протопласты (растительные клетки без внешней оболочки) и плазмиды, кодирующие элементы CRISPR-Cas9. Другой подход, применяемый для растений, – использование агробактерий, природных «генных инженеров», несущих специальную плазмиду.

Благодаря своей простоте, эффективности и широким возможностям система CRISPR-Cas9 за короткое время уже нашла применение в самых различных областях фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии и медицины.

Внося модификации в различные элементы генома клеток животных и растений и изучая последствия, ученые получают возможность исследовать роль отдельных генов в функционировании отдельных клеток и всего организма в целом.

Уникальная способность комплекса системы CRISPR-Cas9 избирательно связываться с определенными участками ДНК позволила разработать на ее основе регуляторы активности генов.

Большие надежды на CRISPR-Cas9 возлагаются и в связи с развитием генотерапии. Несмотря на многолетние исследования, до настоящего времени не удалось разработать приемлемых методов введения в клетки генов, замещающих дефектные. Главная причина неудач – применение генетических конструкций, содержащих «лишнюю» ДНК (бактериальную или вирусную), к тому же встраивались они неуправляемо в произвольные участки генома. Все это приводило к различным нарушениям работы генетического аппарата, в том числе к злокачественному перерождению клеток. В то же время CRISPR-Cas9 позволяет вводить гены в геном с хирургической точностью, что делает генотерапию безопасной.

В ноябре 2017 года в Калифорнии (США) прошла первая в мире процедура по «редактированию» генома взрослого человека прямо внутри его тела. Пациентом стал мужчина с мукополисахаридозом II типа (синдромом Хантера).

Остается много этических вопросов по редактированию эмбриональных клеток человека. Тем не менее, метод редактирования генома, позволяющий осуществлять манипуляции с ДНК, произвел революцию в молекулярной биологии, биотехнологии и медицине. Это открытие можно сравнить с открытием двойной спирали ДНК. Благодаря этой технологии возможно целенаправленное вмешательство в геном живых организмов, в том числе человека, что позволит решать широкий спектр задач, начиная от создания модифицированных видов бактерий, растений и животных, обладающих новыми ценными свойствами, и клеточных моделей, необходимых для создания новых лекарств, до разработки методов генотерапии, открывающей перспективы исправления врожденных генетических нарушений. Открытие новой технологии генетической инженерии CRISPR-Cas9 позволило осуществлять манипуляций на уровне генома высших организмов путем исправления мутаций любого размера от точковых до целого гена.

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Регенеративная медицина является эволюционным этапом на пути развития медицинских технологий. Это междисциплинарное направление, возникшее на стыке наук и технологий, таких как молекулярная и клеточная биология, биохимия и биофизика, морфология и биология развития, клеточная биология и др. Основная задача регенеративной медицины – регенерация поврежденных тканей и органов *in vivo* с помощью методов и технологий, индуцирующих процессы самозаживления. Технологии регенеративной медицины имеют мощный потенциал для лечения неизлечимых заболеваний, таких как сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, инсульт, сахарный диабет и др.

Актуальность регенеративной медицины связана с тем, что развитие этого направления медицины не только снизит бремя тяжелых неизлечимых заболеваний, но и позволит сократить огромные затраты на здравоохранение. Следует отметить, что основные затраты здравоохранения приходится на возрастную категорию пациентов, у которых с возрастом происходит угасание функций органов и тканей. В то же время наблюдается стремительный рост как доли, так и абсолютного числа пожилых людей в составе населения большинства стран мира. Старение населения связано с успехом политики здравоохранения и социально-экономического развития, но при этом ставит перед правительством сложные задачи адаптации пожилых людей: необходимо максимально укрепить им здоровье, а также обеспечить широкие возможности и благоприятные условия жизни. Регенеративная медицина, нацеленная на получение препаратов кожи, трахеи, костно-хрящевой ткани и кровеносных сосудов, выращенных искусственным путем, а в дальнейшем – искусственных органов, будет способствовать решению этих проблем здравоохранения.

Сегодня регенеративная медицина представляет собой междисциплинарную систему научно-исследовательских, практических и социальных (биоэтических) мероприятий, тесно взаимосвязанных и взаимодействующих друг с другом. Организационные аспекты развития данного направления включают дальнейшее масштабирование и трансляцию в клиническую практику научных разработок в данной области.

В настоящее время основными направлениями в области регенеративной медицины являются клеточные технологии, тканевая инженерия, разработка новых биоматериалов, создание искусственных органов (бионика). Следует отметить, что для быстрого внедрения прогрессивных регенеративных технологий в клиническую практику необходимо развитие трансляционной медицины.

Клеточные технологии

Медицину будущего невозможно представить без применения стволовых клеток (СК) и клеточных технологий. Изучение СК приближает нас к пониманию глубинных основ жизни. В то же время проблема СК имеет огромный общественный резонанс, она обсуждается с точки зрения политики, религии, этики и экономики. Интерес общественности связан, в первую очередь, с потенциальной возможностью использования СК для лечения таких болезней, как диабет, болезни Паркинсона и Альцгеймера, врожденные болезни сердца и другие, а также озабоченностью этическими проблемами, связанными с использованием СК.

Классические представления о СК сегодня сильно меняются. Согласно установившимся взглядам взрослые СК могут производить только клетки тех тканей, в которых они находятся. В отличие от них эмбриональные СК, которые научились выращивать в культуре, могут давать начало любым типам клеток организма. Однако последние исследования приносят все новые и новые сведения, согласно которым СК обладают значительной пластичностью, и СК одного типа могут дифференцироваться в клетки других тканей и органов. Например, клетки крови в клетки мозга, клетки крови в клетки печени, клетки мозга в клетки сердца и др. В этом случае перед врачами откроются неограниченные возможности, появится возможность получать СК из таких органов, откуда их легко выделить в больших количествах и после трансдифференцировки использовать для восстановления пораженных органов и тканей.

История вопроса

Термин «стволовая клетка» начали использовать очень давно, и разные исследователи вкладывали в этот термин разное содержание. Идея возникновения термина восходит к представлениям А. Вейсмана (1884) о непрерывности жизни. Можно предположить, что на выбор термина повлияло отображение биологами родственных отношений всего органического мира или отдельных его частей в виде родословного или филогенетического дерева. Свободное использование термина СК связано с тем, что этот термин четко не определен. Эмбриологи называют стволовой любую клетку, которая может давать начало большому числу разнообразных потомков. С этой точки зрения зиготу можно рассматривать как СК, поскольку она дает начало большому числу дифференцированных клеток. Строго говоря, термин СК, если его трактовать в узком смысле слова, как это принято для обновляющихся клеточных популяций взрослого организма, не применим к раннему эмбриогенезу. Взрослые СК разных тканей также значительно различаются по своему поведению, что не позволяет дать единое всеобъемлющее определение.

Более 100 лет назад Вильсон (Wilson, 1896) стволовыми считал клетки герминативной линии (клетки, из которых возникают половые клетки). А.А. Максимов (1915) постулировал существование полипотентной кроветворной стволовой клетки. А.А. Заварзин (1933) называл соединительную ткань, кровь и разные эпителии камбиальными тканями, поскольку в них в течение жизни сохраняются недифференцированные элементы, из которых может пополняться убыль дифференцированных клеток. В 50-е и 60-е гг. достигнуты большие успехи в изучении роли гемопоэтических СК. Было показано, что у летально облученных мышей кроветворение восстанавливается после трансплантации им донорских клеток костного мозга, и в селезенке появляются очаги гемопоэза.

Исследователи, изучавшие пролиферацию быстро обновляющихся тканей, таких как кровь, эпителий кишечника, эпидермис, также использовали термин СК на основании кинетики клеточных популяций. В этих тканях происходит очень быстрое обновление компартмента дифференцированных клеток. Так, в процессе гемопоэза у человека ежедневно продуцируется (и столько же погибает) 1 миллиард эритроцитов и 100 миллионов лейкоцитов. Теоретически было предположено, что образование такого количества специализированных клеток в столь сжатые сроки может быть обеспечено только за счет определенной иерархической организации клеточной популяции. Согласно этой концепции в основании популяции находится небольшая фракция самоподдерживающихся клеток, которые стали рассматривать как стволовые. СК, в свою очередь, производят большое число транзиторных клеток, которые со временем дифференцируются и погибают. Таким образом, в быстро обновляющихся тканях СК поддерживают тканевую гомеостаз за счет образования большого числа транзиторных клеток. В этих тканях СК регулярно вступают в митоз, однако другие типы СК, например в печени, могут длительное время находиться в состоянии покоя и только в случае крайнего истощения пула дифференцированных клеток принимают участие в регенерации.

Основные элементы концепции СК были разработаны при изучении системы гемопоэза, а в дальнейшем были распространены на другие быстро обновляющиеся ткани. Именно в это время были сформулированы два основных свойства СК: способность к длительному самоподдержанию и продукции дифференцированных дочерних клеток. СК – это маленькая популяция относительно недифференцированных пролиферирующих клеток, которые при делении одновременно поддерживают размер своей популяции и продуцируют потомков, вступающих в транзиторный компартмент, в котором они делятся, созревают и превращаются в специализированные типы клеток, необходимые для данной ткани. СК обладают большим пролиферативным потенциалом, благодаря чему сохраняются на протяжении жизни организма и могут служить пролиферативным резервом при регенерации тканей.

Реальные успехи в изучении эмбриональных СК были достигнуты в 80-х годах. Строго говоря, эмбриональные СК не являются стволовыми, поскольку они существуют только *in vitro*. Эмбриональные СК получают путем выделения внутренней клеточной массы из бластоцист и последующим культивированием *in vitro*. Эту операцию проводят на 5-6-й день после оплодотворения у мыши и на 8-9-й день – у человека. Эмбриональные СК мыши были получены в 1981 г., а человека – значительно позже. Есть предположение, что эмбриональные СК могут происходить от ранних зародышевых клеток.

В отличие от взрослых СК, эмбриональные СК обладают плюрипотентностью, то есть могут дифференцироваться и давать начало различным линиям клеток, относящимся к трем зародышевым листкам при инъекции в бластоцисту. Под действием различных факторов роста *in vitro* может происходить направленная дифференцировка эмбриональных СК, что открывает большие терапевтические возможности для использования их в заместительной клеточной терапии.

По мере накопления данных возникла потребность в систематизации СК. Вейгерс и Вейсман классифицировали СК по способности продуцировать клеточные линии на тотипотентные (способные дать начало всему эмбриону и экстраэмбриональным тканям), плюрипотентные (продуцирующие все клетки эмбриона), мультипотентные (дающие начало группе клеточных линий), олигопотентные, которые дают начало более ограниченному числу клеточных линий, чем мультипотентные, и унипотентные, дающие только один тип зрелых клеток. Но эти признаки не являются принципиальными для классификации. Рао предложил механистическую систему классификации СК, подразделяя их на эмбриональные, фетальные, взрослые и специфические для разных тканей. Очевидно, для создания всеобъемлющей естественной классификации СК необходимо более глубокое изучение их биологии.

Очень важным моментом в понимании биологии СК является концепция ниши, поскольку только в нише происходит нормальное самоподдержание и функционирование СК. Уже давно было отмечено, что в организме СК локализованы и функционируют в определенном микроокружении, которое создается соседними клетками, межклеточным матриксом и сигнальными молекулами разного происхождения. Для обозначения микроокружения, которое контролирует поведение гемопоэтических СК, оказавшихся после трансплантации в селезенке, было предложено использовать термин «ниша». Ниша представляет собой группу тканевых клеток и внеклеточный матрикс, которые контролируют пролиферацию и обеспечивают самовоспроизведение СК и продукцию дочерних дифференцированных клеток *in vivo*. Ниша контролирует локальные процессы пролиферации и дифференциации СК, при этом в нише интегрируются сигналы, поступающие от соседних клеток, от организма и от внешней среды.

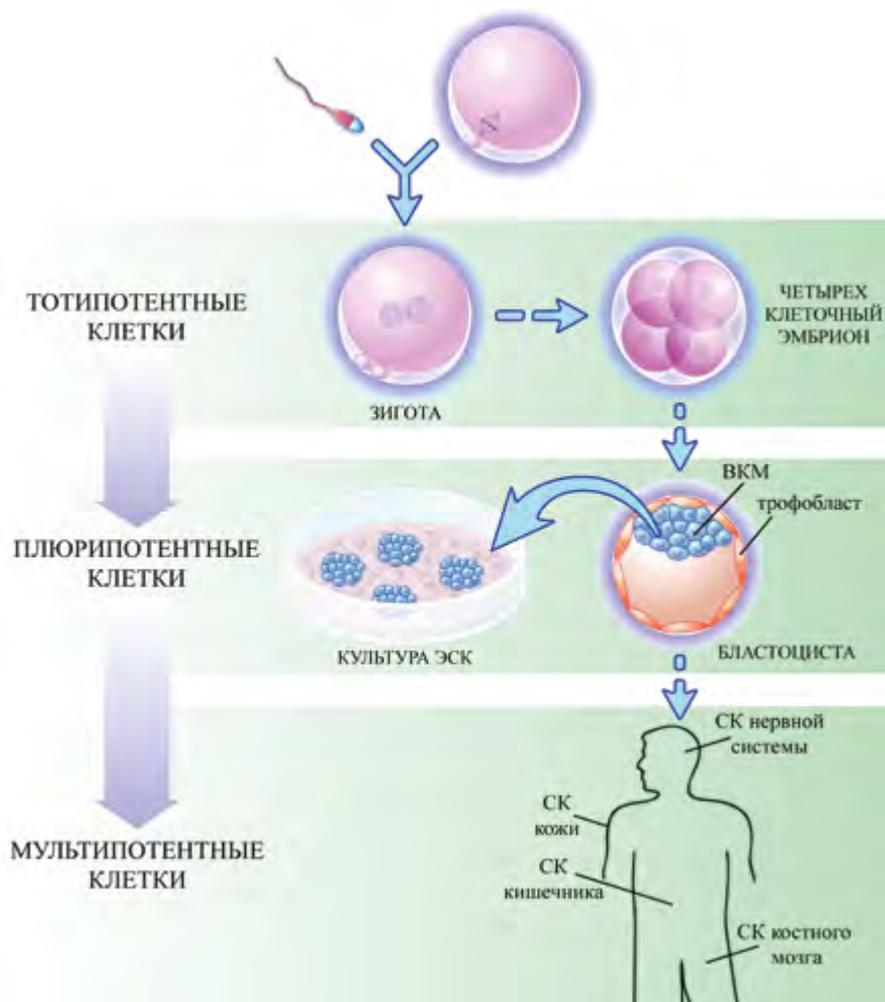
Биологическая значимость СК заключается в том, что они играют центральную роль в организации многоклеточных организмов. СК являются центральным элементом многократно повторяющихся структурно-функциональных единиц, из которых построены органы и ткани, они обеспечивают клеточный гомеостаз и являются пролиферативным резервом органов и тканей.

На протяжении последних десятилетий сформировалась новая концепция, касающаяся поведения СК и их роли в функционировании органов и тканей в норме и в патологических ситуациях, а также применения их в клинической практике. В настоящее время складывается быстро развивающаяся область исследований – технология СК, объединяющая генетические, физиологические и клинические подходы. Изучение биологии СК и клеточных технологий открывает огромные перспективы для развития медицины. Ближайшая задача биомедицинских исследований в этой области – освоение пути от лаборатории до больничной палаты.

Клетка может находиться в нескольких состояниях: пролиферировать, переходить в покой, дифференцироваться и становиться стволовой. Основные черты СК – способность к самоподдержанию, продукции дифференцированных дочерних клеток и образованию клонов. СК обеспечивают гомеостаз быстро обновляющихся тканей и являются пролиферативным резервом. Они составляют очень маленькую часть клеточной популяции, но обеспечивают продукцию огромного количества дифференцированных клеток. В организме СК находятся и функционируют в определенном микроокружении. Они возникают в процессе онтогенеза и часто совершают длительную миграцию в организме, прежде чем займут окончательные ниши. Для характеристики СК используют различные маркеры. Лучше всего охарактеризованы СК крови. В последнее время появляются работы, в которых показана пластичность СК. Понимание процесса образования СК в онтогенезе очень важно для многих аспектов биологии и, возможно, позволит превращать различные клетки организма в стволовые, что будет иметь исключительно большое значение для лечения многих болезней.

Классификация СК

Любой многоклеточный взрослый организм, в том числе человек, развивается из плюрипотентных СК внутренней клеточной массы бластоцисты, производящей триллионы зрелых клеток. В результате оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом образуется тотипотентная зигота, дробление которой приводит к образованию бластоцисты. В бластоцисте различают внешний слой клеток – трофобласт и клетки внутренней клеточной массы (ВКМ). ВКМ в системе *in vitro* дают начало линиям плюрипотентных эмбриональных СК. В процессе развития плюрипотентные клетки ВКМ превращаются в мультипотентные СК, которые все больше и больше ограничены в своем потенциале к образованию специализированных тканей.



Иерархия СК

Выделяют: эпидермальные СК, дающие начало волосным фолликулам и эпидермису; гемопоэтические СК костного мозга; нейральные СК из субвентрикулярной зоны мозга; гастроинтестинальные СК, локализованные в криптах тонкого кишечника; овальные клетки, считающиеся СК печени; мезенхимальные СК костного мозга, способные давать начало кости; стромальные клетки жировой ткани. Есть унипотентные СК, способные образовывать только один вид клеток. Примером являются сперматогониальные СК, образующие только сперматозоиды.

Такая иерархическая модель биологии СК признана основным принципом развития тканей многоклеточного организма. Предполагается, что СК взрослых тканей обладают мультипотентностью, но не плюрипотент-

ностью, как эмбриональные СК. Однако, многочисленные публикации последних лет описывают возможность для СК тканей взрослого организма обладать определенными возможностями плюрипотентных клеток, напоминая эмбриональные СК.

С практической точки зрения перспективы подобных исследований очевидны. Если удастся управлять развитием плюрипотентных СК взрослого организма, то можно предположить последующее развитие биомедицинских технологий по воссозданию и репарации отдельных тканей, органов и систем не только у групп больных с использованием эмбриональных СК и мультипотентных взрослых СК, но и с использованием индивидуальных СК.

Источники СК

В зависимости от источника получения СК их разделяют на три основные группы:

Эмбриональные СК получают из ВКМ бластоцисты до имплантации в эндотелий. Это плюрипотентные клетки. В организме человека насчитывается более чем 200 различных типов клеток. Эмбриональные СК способны образовывать все типы клеток взрослого организма. Эмбриональные СК не имеют антигенов тканевой специфичности, поэтому донорские ЭСК не будут отторгнуты реципиентом. Одним из главных недостатков эмбриональных СК является риск развития злокачественных опухолей.

Фетальные СК получают из плода (около 9–12 недель беременности) после аборта. Это мультипотентные клетки. Медицинский потенциал этих клеток огромен. Однако использование фетальных СК порождает многочисленные этические проблемы. В ряде стран существует запрет на использование фетальных СК в медицинских целях.

Постнатальные СК выделяют из тканей зрелого организма. Преимущества постнатальных СК в том, что эти клетки не вызывают этических проблем и их возможно использовать аутологично, т.е. для нужд собственного организма. К недостаткам можно отнести их меньшую способность образовывать различные типы клеток, т.е. они имеют меньшую потенцию в сравнении с эмбриональными и фетальными СК. В зависимости от типа ткани, из которых их получают, выделяют гемопоэтические (кроветворные), мультипотентные мезенхимальные (стромальные) и тканеспецифичные прогениторные клетки.

Гемопоэтические СК – наиболее полно охарактеризованные СК взрослого организма, находятся в костном мозге и отвечают за непрерывное обновление клеток крови и иммунной системы. Основным источником ГСК является костный мозг. Гемопоэтические СК является первым типом стволовых клеток, использованных в клеточной терапии, и ныне широко применяются при трансплантации костного мозга для лечения апластических анемий, лейкоз, первичных и комбинированных иммунодефицитов.

Мезенхимальные СК первоначально были обнаружены в строме костного мозга, а впоследствии были найдены и в других органах, включая пуповинную кровь, плаценту, печень и жировую ткань. Недавние исследования показали, что мезенхимальные СК распространены повсеместно.

Мезенхимальные СК являются мультипотентными клетками, они способны дифференцироваться в мезодермальные клеточные популяции, такие как адипоциты (жировые клетки), остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и др. Кроме того, показана способность мезенхимальных СК образовывать клетки немезодермального происхождения, например, нейроны, астроциты и гепатоциты. Основным источником мезенхимальных СК – костный мозг, жировая ткань, а также ряд тканей с хорошим кровоснабжением, например, пульпа молочных зубов и пуповинная кровь.

Другим преимуществом мезенхимальных СК, позволяющим их широкое применение в медицине, является очень низкая иммуногенность, что обеспечивает возможность пересадки клеток от любого неродственного донора любому реципиенту без использования иммуносупрессивной терапии.

Перечисленные свойства делают мезенхимальные СК перспективным ресурсом для регенеративной медицины.

Тканеспецифичные прогениторные клетки находятся практически во всех тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции. Эти клетки являются олиго- и унипотентными и, как правило, дают только один или несколько типов клеток.

Свойства СК

СК обладают рядом уникальных свойств, в том числе чрезвычайно высокой пролиферативной активностью и способностью к формированию постоянной клеточной культуры без применения каких-либо иммортализирующих агентов. Проллиферативный потенциал эмбриональных СК существенно выше, чем у собственных СК взрослого организма. Эмбриональные СК не переходят в фазу покоя и не подвергаются старению, проходя циклы деления без каких-либо видимых пределов. К преимуществам их использования относится также возможность их культивирования в бессывороточных средах и отсутствие зависимости от прикрепления к субстрату и контактному ингибированию роста.

Эмбриональные столовые клетки обладают свойством плюрипотентности, т.е. эти клетки способны к дифференцировке и способны давать потомство в виде специализированных типов клеток. Однако избыточные плюрипотентность и пролиферативная способность эмбриональных СК обуславливают повышенную канцерогенность. При введении эмбриональных СК взрослым особям гетерологичного или гомологичного вида отмечается развитие карциномы, что наряду с плюрипотентностью, нео-

граничным ростом и неопределенной продолжительностью жизненного цикла, является свойством эмбриональных СК. В связи с этим перспективны исследования по развитию регенеративной способности зрелых СК с помощью современных биоинженерных подходов.

Многие типы СК способны к адресной миграции в очаги тканевой деградации, где они непосредственно участвуют в обеспечении функционального восстановления органов и тканей или оказывают индуктивное влияние на эндогенные клетки-предшественники через выработку широкого спектра цитокинов, трофических и антиапоптотических факторов.

Основные свойства СК

- **Потентность (дифференцирующий потенциал) – способность давать потомство в виде специализированных типов клеток.**
- **Высокий пролиферативный потенциал – способность к неограниченному делению.**
- **Самообновление – способность сохранять неизменный фенотип после деления (без дифференцировки).**
- **Адресная миграция (хоуминг – эффект) в патологические очаги.**

Молекулярный портрет СК

Первыми (в 1981 году) были получены линии мышинных эмбриональных СК. К настоящему времени эти клеточные линии являются наиболее полно охарактеризованными. В 90-х годах были изолированы и охарактеризованы человеческие линии эмбриональных СК. Первичные зародышевые клетки (primarygerminalcells, PGC), полученные из генитальной складки эмбриона, являются еще одним из известных видов плюрипотентных СК. Существуют также куриные и обезьяньи линии эмбриональных СК.

Для выявления сигнальных путей, регулирующих выбор клеткой определенного направления дифференцировки, исследователи используют различные молекулярные подходы. Традиционно, транскрипция индивидуальных генов исследовалась с помощью гибридизации радиоактивно-меченных проб нуклеиновых кислот – Нозерн-блоттинга. Для этих целей можно использовать также анализ кДНК с последующим ее секвенированием и идентификацией генов. Этот анализ является золотым стандартом для исследования генной экспрессии, но существуют реальные трудности, связанные с большим объемом работы. В ряде исследований были получены результаты экспрессии генов в эмбриональных СК и СК, выделенных от взрослых особей. Казалось бы, при таком анализе легко выявить генетические механизмы обеспечения фенотипа СК, однако был обнаружен целый ряд противоречий при сравнении совокупности экспрессированных генов в обоих типах клеток. До сих пор остается непонятным, является ли это несоответствие причиной технических издержек или это означает, что набор генов, определяющих свойства стволовых клеток, не выявлен.

С одной стороны, известно, что транскрипционный профиль большинства дифференцированных типов клеток составляет только 10–20% содержащихся в их ядрах генов, которые определяют видовую и тканевую специфичность. С другой стороны, известно, что эмбриональные СК экспрессируют 30–60% всех генов. Эти данные можно рассматривать в контексте теории праймирования СК. Предполагается, что СК определенного типа экспрессируют большое число специфичных генов на низком уровне.

В любом случае, очевидно, что значительное количество хроматина, как эмбриональных СК, так и СК взрослого организма, открыто и доступно для экспрессии, и последующая эпигенетическая модификация хроматина и/или метилирование ДНК вызывают ограничение экспрессии генов, что сопровождается дифференцировкой клеток. Возможно, что низкий уровень транскрипции позволяет осуществлять быструю регуляцию генов, необходимую для последующей дифференцировки. Видимо, существуют механизмы репрессии транскрипции, когда уровень транскрипции не превышает пороговые значения до тех пор, пока клетка не получит внутренние и/или внешние сигналы к дифференцировке.

Мышиные эмбриональные СК

Мышиные эмбриональные СК, культивируемые *in vitro* для экспериментальной и исследовательской работы, происходят из внутренней клеточной массы мышинового эмбриона. Эти клетки плюрипотентны, поскольку из них могут развиваться клетки практически всех типов, представленных во взрослом организме.

В ряде исследований сравнивали транскриптомы клеточных линий мышинных эмбриональных СК со СК взрослых особей, дифференцированными клетками и трофоэктодермой. Например, профиль экспрессированных генов мышинных эмбриональных СК линии R1 в сравнении с трофоэктодермой и фибробластами имеет 124 дополнительных гена. При анализе 19 различных тканей, включающих ранние мышинные эмбрионы, новорожденных мышей и СК взрослых мишеней было обнаружено 75 генов, экспрессированных только в линиях эмбриональных СК.

Во всех исследуемых образцах эмбриональных клеток была обнаружена экспрессия фактора транскрипции Oct4, известного также как Pou5F1 или Oct3/4. Было показано, что экспрессия этих генов является критическим моментом для мышинных эмбриональных СК. В отсутствие Oct4 эти СК подвергаются дифференцировке в клетки трофоэктодермы, в то время как потеря Nanog вызывает усиление транскрипции в эндодерме эмбриона. Высокий уровень экспрессии Nanog позволяет эмбриональным СК расти в отсутствие LIF – фактора (leukemia inhibitory factor – лейкоэмический ингибиторный фактор), необходимого для поддержания жизнеспособности мышинных эмбриональных СК в то время, как высокий уровень экспрессии Oct4 вызывает дифференцировку мышинных эмбриональных СК в эндодер-

му и мезодерму. Механизм действия факторов Nanog, Oct4 и LIF опосредован активацией пути JAK-STAT3 (система Janus-киназы в комплексе со STAT – signaltransducerandactivatoroftranscription), в результате чего поддерживается плюрипотентность и способность к самоподдержанию СК.

В исследовании с использованием компьютерного алгоритма определения экспрессии генов было идентифицировано 20 генов, экспрессированных в мышинных эмбриональных СК и в предимплантационных эмбрионах. Они включают Oct4, Nanog, Zfp42 (также известный как Rex1), гены фактора транскрипции Utf1, Ras-подобного гена ESC (Eras), фактора роста TdGF1 (также известного как Cripto). Все эти гены необходимы для самоподдержания СК.

Белок Oct4 в комплексе с транскрипционным фактором Sox2 способствует экспрессии Fgf4, Zfp42, Nanog и собственно гена Oct4. Результаты подобных исследований в совокупности с другими данными способствуют обоснованию определяющей роли Oct4 в регуляции функциональной активности СК.

Эмбриональные СК человека

В ряде исследований был проведен сравнительный анализ транскриптомов клеточных линий эмбриональных СК человека и данных исследования различных видов зрелых дифференцированных клеток человека и мышинных эмбриональных СК. Во всех линиях эмбриональных СК человека были обнаружены 92 гена с повышенным уровнем экспрессии. При этом гены Oct4, Nanog, TDGF1, LIN28, DNMT3B, TGIF, CHEK2, GDF3, CJA1 и FLJ21827 были представлены во всех исследованных линиях. Только 15 из 92 генов были определены как «неизвестные» (в других исследованиях «неизвестных» генов было значительно больше).

В сравнительном анализе профиля экспрессии генов 3-х линий эмбриональных СК человека было обнаружено, что 52% от общего количества генов экспрессированы во всех 3-х клеточных линиях. Общее количество экспрессированных генов составило 7385. При этом совокупность десяти представленных выше генов (Oct4, Nanog, TDGF1, LIN28, DNMT3B, TGIF, CHEK2, GDF3, CJA1 и FLJ21827) была специфична именно для эмбриональных СК человека.

Несмотря на то, что при сравнении эмбриональных СК человека и мышцы было обнаружено много общего, эти два типа клеток имеют существенные различия. Как человеческие, так и мышинные эмбриональные СК обычно культивируют в присутствии мышинных эмбриональных фибробластов, но человеческие СК, в отличие от мышинных, не требуют экзогенного LIF для поддержания их плюрипотентности. В то время, как в мышинных эмбриональных СК фактор LIF необходим для активации сигнального пути JAK-STAT3, в человеческих СК этот путь может активироваться другим способом.

Поддержание плюрипотентности мышинных эмбриональных СК также требует участия BMP4, а в человеческих эмбриональных СК этот фактор вызывает дифференцировку трофобласта, а функцию сохранения плюрипотентности вместо BMP выполняет FGF-2.

Существуют принципиальные различия в активации сигнальных путей для поддержания плюрипотентности мышинных и человеческих эмбриональных СК. Эти различия могут объяснить различия в экспрессии генов в мышинных и человеческих эмбриональных СК: в них обнаруживается от 13 до 55% сходной транскрипции РНК в то время, как при сравнении различных линий человеческих СК определяется 85–99% соответствия. Кроме того, известны гены, которые экспрессируются только в мышинных СК и не экспрессируются в человеческих. Например, ZFP42 не экспрессируется в человеческой линии HES4, STAT3 – в линии H9, Sox2 (белок Sox2 относится к семейству Sry-связанных факторов транскрипции) и ESG1 – не экспрессируются в различных линиях. В мышинных эмбриональных СК для активации транскрипции Oct4 требуется наличие Sox2. Приведенные выше данные о различиях в генной экспрессии мышинных и человеческих эмбриональных СК подтверждают возможность того, что в человеческих СК передача сигнала возможна без участия Sox2, хотя он присутствует в клетках. При сравнении широкого спектра факторов транскрипции, ассоциированных с мышинными и человеческими эмбриональными СК, было обнаружено, что и те и другие клетки экспрессируют Oct-4, Sox2, Tert, Utl1 и Rex-1. В экспрессии виментина, β -тубулина, Альфа-фетопротеина, эомезодермина, ARNT, Foxd3 и рецептора LIF были обнаружены значительные различия.

Тканеспецифичные соматические СК человека

Тканеспецифичные СК представлены в органах очень небольшой фракцией и характеризуются тремя основными признаками:

- 1) способностью к самообновлению с образованием таких же СК с целью сохранения пула СК;
- 2) способностью к асимметричному делению, в результате которого происходит образование коммитированных к дифференцировке в нужном направлении дочерних клеток – прогениторных клеток (ПК), с помощью которых ткань обеспечивается функционально активными клетками;
- 3) способностью к регуляции деления в зависимости от потребности ткани.

Фенотип различных тканеспецифичных СК характеризуется следующими маркерами: маркерами кроветворной СК являются CD34+, CD38-, Thy1-, Lin-, СК мозга – CD133+Lin-, предстательной железы – CD133+, a2 β 1hi.

До недавнего времени было принято считать, что СК взрослых, в отличие от эмбриональных, способны образовывать субпопуляции только тех

клеток, которые имеют общее происхождение в процессе эмбриогенеза, а их дифференцировка и регенеративный потенциал определяются под влиянием микроокружения в той ткани, в которой они оседают. В настоящее время эти представления пересматриваются, так как оказалось, что тканеспецифические соматические СК взрослых обладают гораздо большей пластичностью, чем предполагалось ранее. Прежде всего, это положение относится к СК костного мозга. Кроветворные СК костного мозга способны дифференцироваться не только в любые зрелые кроветворные клетки, но и в некоторые другие типы клеток – нервные клетки, клетки печени, поджелудочной железы, миокарда, эпителия, кожи и др. Мезенхимальные СК костного мозга также способны дифференцироваться в клетки тканей, имеющих различное эмбриональное происхождение. Это свойство назвали пластичностью СК.

Опухолевые СК

Благодаря накоплению знаний о СК произошло открытие опухолевых СК. СК злокачественных опухолей обладают схожими свойствами с обычными СК: они способны к неограниченной нерегулируемой пролиферации, могут проникать в нормальные ткани, разрушая их, они обладают относительной автономностью и способностью к прогрессированию. Кроме того, опухолевые клетки, как правило, устойчивы к индукции программированной клеточной гибели и обладают способностью индуцировать ангиогенез.

Опухолевая ткань представляет собой патологический процесс, представленный новообразованной тканью, которая состоит из разнородных клеточных популяций, различающихся по степени дифференцировки. В зависимости от морфологических особенностей и патофизиологических свойств опухоли классифицируют на доброкачественные и злокачественные. На основе этого строится прогноз заболевания.

Результаты, накопленные в процессе изучения СК и особенностей развития опухолей, позволяют считать, что в опухолевой ткани присутствуют опухолевые СК, из которых и образуется опухоль. Одна из патогенетических теорий образования опухолей основана на представлениях о существовании опухолевых СК, возникающих из нормальных СК, в которых в течение жизни накопились генетические мутации и произошло их перерождение в опухолевые СК. Опухолевые СК обеспечивают появление опухоли и поддерживают рост опухоли. Другая гипотеза предполагает, что в прогениторной клетке или даже в дифференцированной клетке могут возникать изменения, которые вернули клетку в исходное стволовое состояние. Третья гипотеза предполагает возникновение опухолевой СК в результате слияния СК с дифференцированной клеткой с образованием гибридных клеток со свойствами опухолевой СК.



Механизмы образования опухолевой СК

Патогенез опухолей, основанный на знаниях опухолевых СК, позволит сформулировать новые представления о закономерностях развития опухолей и способах их терапии. Изучение сигнальных путей опухолевых СК и применение таргетных ингибиторов будут лежать в основе химиотерапии опухолевых заболеваний. Поиск путей блокирования миграции опухолевых СК будет способствовать предотвращению метастазирования и инвазии опухолевых клеток.

Культивирование СК

С целью увеличения выхода и улучшения регенеративных свойств СК в настоящее время ведутся работы по совершенствованию процессов культивирования и очистки СК. Современные условия культивирования мезенхимальных СК и иных типов СК с целью повышения биологической безопасности подразумевают предпочтительное использование бессывороточной среды, не содержащей потенциально иммуногенных белковых добавок животного происхождения. В качестве альтернатив питательным средам с животными добавками для культивирования СК внедрены среды, содержащие человеческую сыворотку и/или активированные тромбином лизаты тромбоцитов человека. Показано, что использование таких сред не только увеличивает продукцию СК, но и улучшает их регенеративные свойства и пролиферативный потенциал.

При выращивании адипоцитов из мезенхимальных СК перспективно культивирование СК в матриксе, состоящем из денатурированного коллагена I типа, что позволяет получить адипогенный потенциал культивируемых клеток и достичь клеточной плотности, достаточной для последующей пересадки с целью регенерации печени.

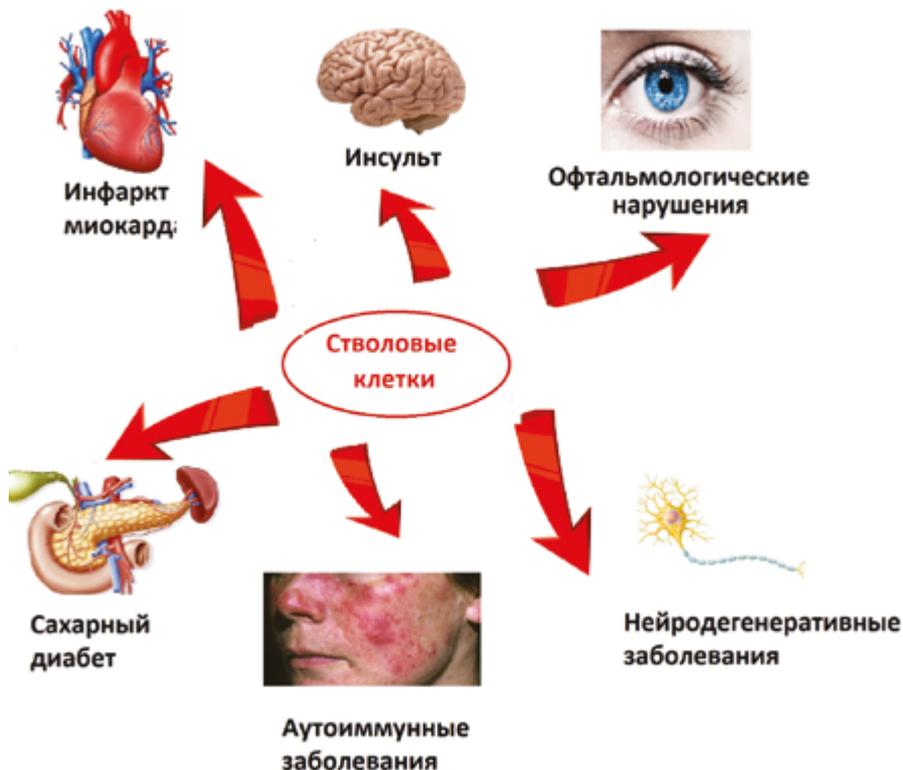
Для очистки мезенхимальных СК традиционно используют их способность избирательно прикрепляться к пластиковой подложке. Для характеристики фенотипа полученных мезенхимальных СК обычно используют проточную цитометрию для анализа экспрессии поверхностных биомаркеров. К настоящему моменту придумано и разработано достаточно технологических усовершенствований, улучшающих культивирование и выделение СК.

СК и регенеративная медицина

Регенеративная медицина достигла огромных успехов в области лечения дефектов кожи, хряща, кости, рога и других тканей. В настоящее время быстро развиваются технологии с использованием СК, которые объединяют генетические, физиологические и клинические подходы. Большие перспективы для клинической практики открывает использование эмбриональных СК. Помимо этических моментов, использование эмбриональных СК может столкнуться с проблемой гистосовместимости. Эмбриональные СК можно длительное время культивировать и стимулировать их дифференциацию *in vitro*, что позволит в будущем использовать эти клетки для трансплантации в клинику.

В настоящее время СК эффективно применяются в гематологии и для восстановления кожного покрова. Активно разрабатываются многочисленные аспекты клинического использования СК. В качестве примера можно рассмотреть перспективы использования СК для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, которые выходят на первое место среди других заболеваний. Длительное время считали, что в сердце нет СК, и поэтому оно не способно восстанавливать потерю клеток. Однако были обнаружены прогениторные клетки, которые по своим свойствам были похожи на СК и были способны поддерживать регенерацию пораженных участков. Один из терапевтических подходов может заключаться в том, чтобы с помощью введения факторов роста активировать пролиферацию эндогенных СК и способствовать таким образом репарации повреждений. СК сердца могут дифференцироваться в кардиомиоциты *in vivo* и могли бы участвовать в репарации повреждений после инфаркта миокарда, но число этих клеток очень невелико. Возможный подход заключается в том, чтобы вырастить СК взрослого сердца *in vitro*. В постнатальном миокарде человека и крысы были найдены прогениторы, которые после культивирования сохраняют способность принимать фенотип дифференцированных кардиомиоцитов и могут быть использованы в клинике вместо эмбриональных СК.

Другой подход может заключаться в использовании эмбриональных СК, поскольку их дифференциацию *in vitro* можно направлять по пути формирования кардиомиоцитов при определенных условиях культивирования и использовании факторов роста.



Применение СК в медицине

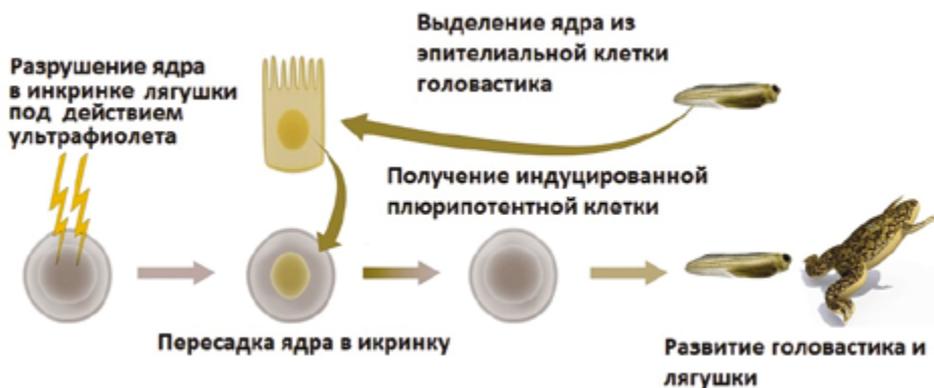
Перепрограммирование дифференцированных клеток. Получение индуцированных плюрипотентных клеток

Человеческие плюрипотентные СК имеют большие перспективы для фундаментальных исследований и регенеративной медицины из-за их свойства размножаться бесконечно, сохраняя при этом потенциал для дифференцировки в любой тип клеток человеческого организма. С момента первого получения в 1998 году плюрипотентные эмбриональные СК человека были подробно изучены, однако наличие этических проблем сдерживает трансляцию этих исследований в клинику. Получение плюрипотентных клеток, подобных эмбриональным, в результате перепрограммирования соматических дифференцированных клеток открывает дополнительные возможности в области использования эмбриональных СК.

Перепрограммирование (репрограммирование) клеток – процесс искусственного возвращения специализированных соматических клеток в состояние СК. Такие клетки называются индуцированными плюрипотентными СК(ИПСК, iPSC). За открытие перепрограммирования зрелых соматических клеток в 2012 году была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине Джону Гардону (John B. Gurdon) и Шинье Яманакэ (Shinya Yamanaka).

Английский ученый Джон Гардон еще в 1962 году продемонстрировал, что пересадка ядра эпителиальных клеток головастика в икринку, в которой собственное ядро было разрушено под действием ультрафиолетового излучения, превращается в головастика, а затем во взрослую особь – лягушку. Иными словами пересадка ядра от соматических дифференцированных клеток дает возможность возвращения генетической программы к исходному состоянию плюрипотентности, т.е. генетическая информация не изменяется в клетке на протяжении всего срока её жизни, что дает возможность использовать эту информацию снова. Эти исследования Джона Гардона положили начало технологии клонирования.

Возможно ли достичь перепрограммирования клетки без пересадки ядра? Работы японского ученого Шиньи Яманакэ позволили выделить из 24 генов транскрипционных факторов только 4 гена, необходимых для перепрограммирования. В качестве объекта был выбран фибробласт, который трансформировали вектором из 4 генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Полученные клетки были названы СК.



Перепрограммирование ядра клеток эпителия головастика.

(По: <https://biomolecula.ru/articles/nobelevskaia-premiia-po-fiziologii-i-medsine-2012-indutsirovannye-stvolovye-kletki-s-modifikatsiyami>)



Получение индуцированной плюрипотентной клетки путем введения четырех транскрипционных факторов
(По: <https://biomolecula.ru/articles/nobelevskaia-premiia-po-fiziologii-i-meditsine-2012-indutsirovannye-stvolovye-kletki-s-modifikatsiyami>)

Сегодня существует несколько способов получения индуцированной плюрипотентной клетки.

1. Перенос ядра из соматических клеток в яйцеклетку, в которой удалено собственное ядро.

Эти эксперименты служат доказательством того, что в процессе развития организма не происходит необратимых изменений генома.

2. Слияние соматической клетки и эмбриональной СК. При слиянии соматических и эмбриональных СК образуются гибридные клетки, обладающие плюрипотентными свойствами. Эти эксперименты подтверждают идею, что эмбриональные клетки человека имеют потенциал для перепрограммирования соматических ядер после слияния.

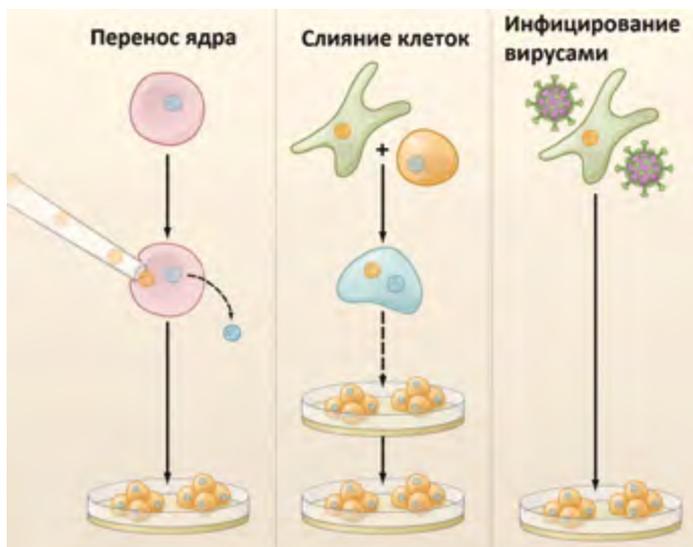
Хотя метод слияния не основан на ядерном переносе для получения плюрипотентных клеток, тетраплоидия перепрограммированных клеток представляет собой серьезный недостаток для использования этого подхода для индивидуальной клеточной терапии.

3. Перенос с помощью вирусов генов, обеспечивающих перепрограммирование соматической клетки в плюрипотентную. Первые исследования в этом направлении трансфицировали 4 гена Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Перепрограммирование клеток шло в 2 этапа: вначале образовывались частично перепрограммированные клетки (<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/fbx15>), а затем полностью перепрограммированные IP-клетки, экспрессирующие Oct4 или Nanog. Nanog является основным фактором, определяющим плюрипотентность. В

последующих экспериментах для образования плюрипотентности наряду с Oct4, Sox2, Klf4 вводили ген Nanog (информация об этих факторах транскрипции – в таблице). При этом был исключен с-Мус, который оказался онкогенным и у 20% мышей развились опухоли.

Факторы транскрипции, поддерживающие плюрипотентность СК

Название	Характеристика
Oct4	Участвует в самообновлении недифференцированных эмбриональных СК. Используется как маркер для недифференцированных клеток. Изменение уровня экспрессии Oct4 приводит к дифференцировке клеток. Различные другие гены из этого семейства, например Oct1 или Oct6, не влияют на перепрограммирование клеток, что говорит об уникальности свойств Oct4.
Sox2	Необходим для поддержания плюрипотентности недифференцированных эмбриональных СК. Sox2 играет важную роль в поддержании эмбриональных и нервных СК, а также играет ключевую роль на многих этапах развития млекопитающих. Основная роль Sox2 в эмбриональных СК заключается в контроле экспрессии Oct4. Потеря плюрипотентности регулируется гиперметилированием некоторых сайтов связывания Sox2 и Oct4. Гиперэкспрессия Sox2 в дифференцированных клетках приводит к гиперплазии клеток и развитию опухолевых клеток. К настоящему времени выявлено участие Sox2 в развитии плоскоклеточного рака легких, глиобластомы, рака предстательной железы, колоректального рака, рака молочной железы и др.
Klf4	Впервые был идентифицирован в 1996 году. Klf4 участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и перепрограммировании соматических клеток. Klf4 является супрессором опухоли при некоторых видах рака, включая колоректальный рак. Klf4 имеет разнообразные функции, он экспрессируется в недифференцированных клетках, и его чрезмерная экспрессия индуцирует остановку клеточного цикла. Klf4 особенно важен для предотвращения деления клеток при повреждении ДНК. Klf4 также играет важную роль в регуляции числа центросом и числа хромосом (генетическая стабильность) и способствует выживанию клеток, однако некоторые исследования показали, что при определенных условиях Klf4 может переключать свою роль с выживания клеток на их гибель.
с-Мус	Участвует в регуляции экспрессии 15% всех генов за счет увеличения ацетилирования гистонов. Мутации гена с-Мус обнаружены во многих опухолях, при этом ген экспрессируется постоянно, что приводит к нарушению регуляции активности многих генов, в том числе отвечающих за пролиферацию клеток. Временное ингибирование гена МУС селективно уничтожает клетки рака лёгкого мыши. Таким образом, Мус является потенциальной мишенью для лекарственных средств.
Nanog	Участвует в поддержании плюрипотентности СК. Экспрессия гена Nanog наблюдается в эмбриональных СК и является основным фактором, обеспечивающим плюрипотентность. Nanog вместе с Oct-4 и Sox2 обеспечивает фенотип эмбриональных СК. В случае мутации гена Nanog происходит дифференцировка эмбриональных СК в другие типы клеток.



Стратегии получения индуцированной плюрипотентной СК.

(По R. Jaenisch and R. Young (2008) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015> с модификациями.

Перепрограммирование дифференцированных клеток – знаковое открытие в биологии, имеющее большие перспективы как для фундаментальных исследований, так и для регенеративной медицины. Благодаря этой технологии появилась надежда восстанавливать утраченные клетки. Инфаркт миокарда, нейродегенеративные заболевания и многие другие имеют реальные перспективы для излечения.

Терапевтический потенциал индуцированных плюрипотентных СК (ИПСК) человека

Получение специфичных для пациента плюрипотентных СК была одной из главных целей в области регенеративной медицины. Дифференцировка ИПСК на отдельные типы клеток имеет первостепенное значение просто потому, что доступ к большому количеству клеток позволит использовать их вместо трансплантации целых органов. Поскольку ИПСК рассматривают как источник для получения неограниченного количества специфичных для пациента клеток для трансплантации, очень важно точно понять процессы, которые направляют созревание клетки и, таким образом, помогают повторить эти события *in vitro* и создать искусственные клетки и ткани. Теоретически ИПСК человека могут применяться для лечения широкого спектра заболеваний человека.

Потенциал развития *in vitro* и успешность применения ИПСК в моделях животных раскрывают принцип использования клеток, полученных из ИПСК человека, в качестве регенеративного источника для трансплантационной терапии.

В течение последних нескольких лет было создано несколько моделей заболеваний, которые подтвердили, что ИПСК способствуют излечению ряда заболеваний.



Применение индуцированной плюрипотентной клетки в медицине.

(По: <https://biomolecula.ru/articles/nobelevskaia-premiia-po-fiziologii-i-medsine-2012-indutsirovannye-stvolovye-kletki-s-modifikatsiyami>).

Примеры успешного применения ИПСК на моделях животных

Название болезни	Клетки, полученные из ИПСК
Спинальная мышечная атрофия (SMA)	Астроциты, нейроны, зрелые мотонейроны
Болезнь Паркинсона	Вентральные дофаминергические нейроны среднего мозга
Синдром Ретта	Нейронные клетки-предшественники
Мукополисахаридоз IIIВ типа	Дифференцированные нейроны и нейральные СК
Шизофрения	Нейроны
X-сцепленная аденолейкодистрофия (x-ALD) и аденомиелонейропатия (AMN)	Нейроны, олигодендроциты
Пигментный ретинит	Предшественники фоторецепторов, ретинально-пигментные эпителиальные клетки, палочковые фоторецепторные клетки, ретинальные предшественники
Болезнь Альцгеймера (семейная и спорадическая)	Нейроны
Анемия Фанкони	Гемопоэтические клетки

Синдром леопарда	Кардиомиоциты
Синдром удлинённого интервала QT 1-го и 2-го типов	Кардиомиоциты
Рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз (РДЭБ)	Кроветворные и негемопозитические клетки
Семейная дилатационная кардиомиопатия	Кардиомиоциты
Болезнь Гентингтона	Нейроны
Гликогенозы	Гепатоциты
Семейная гиперхолестеринемия	Гепатоциты
Болезнь Вильсона	Гепатоциты
Гепатит С	Гепатоциты

В этой связи первые клинические испытания с использованием клеток, полученных из ЭСК человека, заложили основу для будущего клинического применения ИПСК. Недавно компания Advanced Cell Technology провела исследование возможности замещения клеток для оценки безопасности лечения макулярной дистрофии путем трансплантации человеческих ЭСК-производных пигментных клеток сетчатки. Несмотря на первоначальный успех в этом испытании, радоваться еще слишком рано – нельзя исключать появление отсроченных эффектов у этих пациентов. Несмотря на это обнадеживающее испытание ЭСК человека в глазу, который является иммунно-привилегированным органом, многие препятствия должны быть устранены до того, как определенные типы клеток, полученные из ИПСК, могут быть применены к людям.

Во-первых, представление персонализированной медицины в виде специфической для пациента клеточной терапии на основе ИПСК является весьма перспективным, но дорогостоящим методом. Во-вторых, должны быть разработаны единообразные стандарты для работы с человеческой культурой ИПСК, условия дифференциации и криоконсервации. В-третьих, крайне важно разработать эффективный альтернативный подход к вирусному перепрограммированию и пониманию генетических и эпигенетических изменений, происходящих в ходе этого процесса. Кроме того, следует исключить риск образования тератом, токсичности и иммунологического отторжения.

Таким образом, для того, чтобы технологию ИПСК можно было регулярно применять в клинике, еще предстоит отработать несколько моментов по разработке моделей заболеваний *in vitro*, оценке безопасности и эффек-

тивности, протоколов дифференцировки различных типов клеток, например, кардиомиоцитов, гепатоцитов и нервных клеток. Кроме того, многое станет ясным после клинических испытаний с использованием клеточных продуктов, полученных на основе ЭСК человека, которые в будущем могут быть перенесены на ИПСК человека.

Получение индуцированных плюрипотентных СК из соматических клеток организма может существенно стимулировать применение взрослых СК в клинике. При этом не встает вопрос об иммунологической совместимости клеток. Однако в этой области также предстоит большая работа для получения генетически стабильных линий клеток. Развитие техники выделения и культивирования СК делает их удобным материалом для создания живых тканевых эквивалентов, которые можно широко использовать для лечения обширных ожогов, трофических язв, длительно незаживающих ран и других заболеваний. Способность СК встраиваться в тканевые структуры организма под контролем микроокружения реципиента делает их идеальным средством для цитозаместительной терапии. Следует отметить, что большая часть исследований еще находится не на таком уровне, когда они могли бы быть использованы непосредственно в клинике. Предстоит длительная работа по совершенствованию технологии получения и использования СК. Тем не менее уже сейчас можно констатировать, что сформировалась новая быстро развивающаяся область перспективных исследований – биомедицина СК.

Генная терапия с использованием СК

Генная терапия с использованием СК – перспективное направление молекулярной медицины.

С помощью методов генной инженерии возможно исправление генетической мутации путём встраивания полноценного гена в геном СК. Устранение генетического дефекта возможно путём преодоления барьера HLA-гистонесовместимости при аллогенных трансплантациях. Путем генетической модификации можно скорректировать метаболические процессы, усилить пролиферативный и дифференцировочный потенциал СК, направить их дифференцировку в нужное русло. Способность некоторых типов СК к направленной адресной миграции (хомингу) в очаги тканевой деструкции и опухолевого роста позволяет использовать генетически модифицированные СК в качестве средств адресной доставки целевых генов.

Для оптимального проведения генной терапии необходимо понимание патогенеза заболевания на молекулярном уровне и выявление повреждения на генетическом уровне. Сегодня генная терапия перспективна для лечения моногенных наследственных и ряда мультифакториальных заболеваний, таких как онкологические, инфекционные, нейродегенеративные и др. Другое важное условие успешного проведения генной терапии – выбор СК, предназначенных для генетической модификации.

При лечении наследственных заболеваний новый ген должен функционировать в организме длительное время. Он не должен утрачиваться клетками и должен передаваться дочерним клеткам при делении. С этой целью перспективно использование эмбриональных клеток, так как они обладают всеми необходимыми свойствами.

Для терапии заболеваний системы крови перспективно использование генномодифицированных гемопоэтических стволовых клеток. Это клетки, экспрессирующие CD34 и способные к пролиферации в бессывороточной среде, содержащей ростовые факторы и цитокины, и долговременному сохранению неизменного фенотипа после деления. Гемопоэтические СК выделяют из костного мозга, периферической и пуповинной крови.

Генная терапия заболеваний системы крови с использованием гемопоэтических СК перспективна при лечении синдрома тяжёлого комбинированного иммунодефицита (ТКИД) путём коррекции мутантного гена, кодирующего фермент аденозиндезаминазу, при лечении серповидно-клеточной анемии (СКА) путём генетической коррекции мутации в глобине.

Мезенхимальные СК обладают выраженным хоумингом к опухолям. Способность к длительной персистенции в организме реципиента делает эти клетки удобными для генной терапии. Мезенхимальные СК проявляют высокий уровень метаболической активности и способность к синтезу целевого терапевтического белка. Простота выделения, неприхотливость в условиях культуры, возможность масштабного наращивания *in vitro* – еще одна из весомых причин их использования в качестве носителей лечебных генов.

Хорошие результаты по использованию мезенхимальных СК с использованием геннотерапевтических мероприятий в экспериментах на животных были продемонстрированы при регенерации костной ткани. Они могут быть использованы для восстановления костной ткани при наследственном заболевании с несовершенном остеогенезом.

Генетически модифицированные мезенхимальные СК демонстрируют хорошие результаты в экспериментах на животных при лечении нарушений липидного обмена, нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, инсультов, инфаркта миокарда.

Нейральные СК, в отличие от гемопоэтических и мезенхимальных СК, имеют ограниченное применение в связи со сложностью их получения. Чаще всего в эксперименте используют клеточную линию фетальных нейральных СК человека. Были продемонстрированы успешные результаты коррекции неврологических нарушений в экспериментальных моделях ряда наследственных заболеваний, таких как болезни Паркинсона и Хантингтона, мукополисахаридоза VII.

Нейральные СК проявляют хоуминг к различным типам опухолей нервной системы. Даже системно введенные нейральные СК способны преодолевать гемато-энцефалический барьер, мигрировать к опухоли и

инкапсулировать ее. В экспериментальной онкологии нейральные СК используют для адресной доставки продуктов суицидальных генов в опухолевую ткань, что способствует уменьшению размеров опухоли.

Таким образом, генная клеточная терапия является перспективным направлением медицины будущего. Благодаря мощному прорыву в изучении фундаментальных аспектов биологии СК и стремительному совершенствованию методов генной инженерии достигнуты успехи в лечении ряда моногенных и мультифакториальных наследственных заболеваний.

Тканевая инженерия

Одним из направлений регенеративной медицины является тканевая инженерия, ориентированная на создание биологических заменителей патологически измененных тканей и органов и имплантации их в организм с целью компенсации утраченной функции.

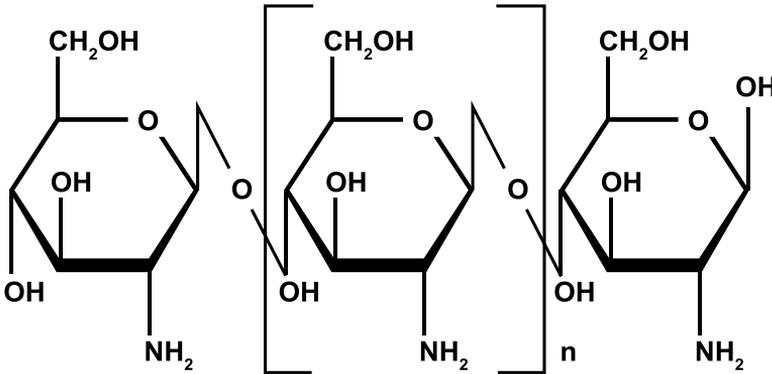
Биоматериалы в тканевой инженерии

Общая стратегия тканевой инженерии заключается в том, чтобы совместить 3D - полимерный каркас со специализированными живыми клетками. Каркас обеспечивает поддержку клеток, в то время как клетки способствуют биологической функциональности. Каркас может принимать различную форму, например, сетки или заплаты. Оптимальный биоматериал каркаса усиливает прикрепление клеток и способствует их пролиферации и дифференцировке. Чтобы инициировать обновление тканей, биоматериал каркаса должен интегрироваться с тканью хозяина и способствовать васкуляризации для обеспечения адекватного снабжения кислородом. В то же время каркас должен быть биоразлагаемым, чтобы в конечном итоге он был полностью удалён из организма.

Источником клеток при тканевой инженерии служат СК, клетки крови и различных тканей. Могут использоваться СК различного происхождения: аутологичные (т.е. взятые у того же организма, которому будут пересажены); изогенные (т.е. изолированные из генетически идентичных донора и реципиента – близнецов, клонов); аллогенные (клетки донора и реципиента относятся к одному виду); ксеногенные (клетки разных видов). Из тканей клетки получают путем растворения межклеточного матрикса в результате обработки протеолитическими ферментами (коллагеназа, трипсин и т.д.), после чего клетки экстрагируют с помощью центрифугирования или сепарации.

Для создания каркасов используют природные и искусственные материалы. В качестве природных материалов чаще всего применяют различные природные полимеры, включая хитозан, шелк, фибрин, спонгин. При этом в последнее время хитозану и его производным отдают все большее предпочтение ввиду его повышенной биосовместимости, возможности

биodeградации, способности к легкой химической модификации, высокому сродству к макромолекулам, антибактериальных и заживляющих свойств, а также наличию пор и способности инициировать гелеобразование.



Химическая формула хитозана

При использовании в качестве каркаса соединительной ткани млекопитающих ксеногенного происхождения необходимо освободить ее от клеток (децеллюляризация) с использованием мягких детергентов (например, дезоксихолиновой кислоты).

Пористые гидрогели, используемые для регенерации мягких и твердых тканей, выполняют роль межклеточного биodeградируемого матрикса, который способствует росту и экспансии пересаженных клеток в организме реципиента. Для создания гидрогелей используют разнообразные природные и искусственные полимеры – полисахариды (декстраны, гиалуроновая кислота, глюкозаминогликаны), полиэтиленгликоль, полипептиды, например, желатин или фрагменты фибриногена и т.д., подвергающиеся различным химическим модификациям. Гидрогели также можно использовать в качестве депо для длительной доставки различных ростовых и иных биомолекул (например, костных морфогенетических белков семейства BMP – регуляторов остеогенеза), стимулирующих пролиферацию и дифференцировку клеточного имплантата.

Широкое применение в тканевой инженерии нашли также различные искусственные полимерные материалы, одним из неоспоримых достоинств которых является возможность получения из них наночастиц, размер и структура которых имитирует нанотопографию природного внеклеточного матрикса, что позволяет копировать естественные свойства соединительной, хрящевой, зубной и костной ткани. Такой подход используется для создания искусственных полимерных наночастиц размером 5–500 нм, имитирующих свойства коллагеновых фибрилл сухожилий, получения наносфер из гидроксиапатита с полимерными синтетическими добавками из полилактата, полилактата-полигликолата и полиамида для

получения биокерамических зубных имплантов и пористых микросфер из $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$, используемых для создания костных имплантов.

Современные биоматериалы для тканевой инженерии должны соответствовать выполнению сложной практической задачи. При разработке и выборе новых биоматериалов необходимо учитывать механические, физические, химические и биологические свойства. Биоматериалы должны демонстрировать достаточные физические и механические свойства для того, чтобы выполнять физиологическую функцию.

Биоматериалы должны соответствовать требованиям биосовместимости с целевым участком, выполняя нужную функцию и не вызывая отрицательных последствий. Полимерная конструкция и продукты разложения не должны вызывать цитотоксическую, гемолитическую, воспалительную реакции. Также должны быть исключены такие нежелательные реакции как раздражение и сенсибилизация. Биоматериал не должен мешать заживлению ран или вызывать повышение свертываемости крови; также необходимо, чтобы материал не был благоприятной средой для бактерий во избежание распространения инфекции.

Биоматериалы для регенерации тканей должны деградировать в физиологической среде, чтобы обеспечить заживление и рост тканей. Разлагаемые биоматериалы должны включаться в физиологический метаболизм, а деградация должна быть достигнута путем гидролиза или ферментативного расщепления. Продукты разложения должны легко выводиться почками. Время деградации должно быть настроено таким образом, чтобы материал оставался на целевом участке до прекращения патологического процесса.

С этой целью в ходе выбора и создания новых биоматериалов для тканевой инженерии повышенное внимание уделяют изучению и контролю их биологических характеристик, таких как нетоксичность, апирогенность, биосовместимость (неиммуногенность), прочность, адгезивность для клеток, способность к биодеградации и т.д.

Количество и длина поперечных швов придают гидрогелям и прочим биоматериалам объем, пористость и прочность. При remodelировании верхних дыхательных путей (бронхов и альвеол), эпителий которых богат внеклеточными металлопротеазами, инженерным каркасам придают свойства повышенной способности к биодеградации под действием именно металлопротеаз путем насыщения низкомолекулярными гиалуроновыми кислотами и пептидами, содержащими участки расщепления для металлопротеаз. Для повышения адгезивных свойств биоинженерных каркасов по отношению к пересаживаемым клеткам в состав каркасов включают пептидные матрицы, содержащие участки связывания интегринов – поверхностных рецепторов, которые осуществляют межклеточные и тканевые взаимодействия.

Наконец, биоматериалы для тканевой инженерии должны удовлетворять требованиям коммерческой и клинической целесообразности. Иде-

альный биоматериал для медицинского применения должен быть легко имплантирован или доставлен через удобное устройство. Оптимальная система должна требовать минимального времени предварительной подготовки. Производство полимерной конструкции должно быть масштабируемым, чтобы обеспечить рентабельность изготовления; это качество особенно важно для повсеместного использования этих технологий, в том числе в странах с низким и средним уровнем дохода.

Методы тканевой инженерии

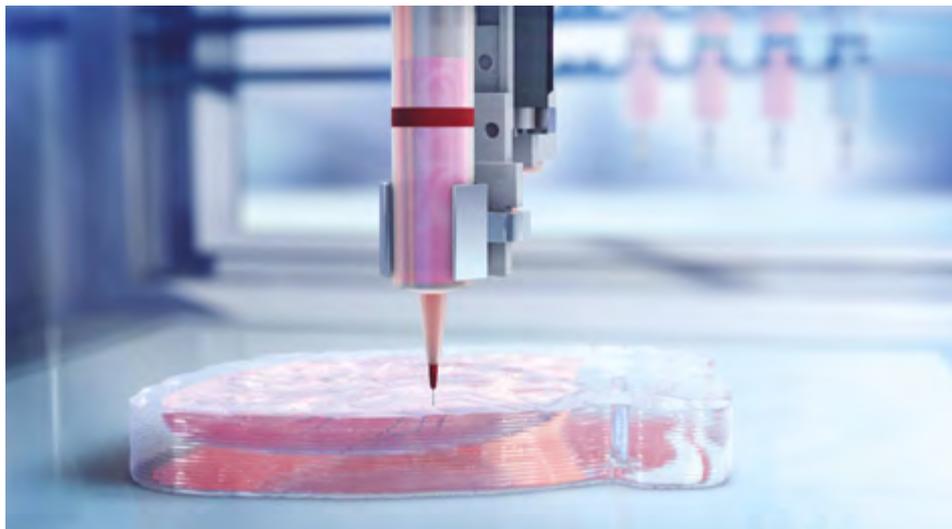
Основными методами тканевой инженерии являются терапевтическое клонирование и биопринтинг. Под терапевтическим клонированием понимают перенос ядра в безъядерную реципиентную яйцеклетку с целью получения потомства (клонов), генетически идентичного донорскому организму. Яйцеклетка обладает необходимым потенциалом для репрограммирования пересаженного ядра взрослой соматической клетки в эмбриональное состояние, способное к индукции развития нового организма. Таким образом можно создавать практически неограниченный источник плюрипотентных СК (включая клетки, специфические для данного индивида) для успешного решения задач тканевой инженерии.

Техника терапевтического клонирования имеет большие перспективы в борьбе с заболеваниями человека, вызванными мутациями в митохондриальной ДНК (мтДНК). Поскольку такие заболевания наследуются по материнской линии путем передачи зародышу ооцитарной цитоплазмы, содержащей митохондрии с мутантной ДНК, пересадка цитоплазмы с нормальными митохондриями или перенос ядра от женщины, имеющей мутацию в мтДНК, в нормальную лишённую собственного ядра яйцеклетку, должны привести к генетической коррекции потомства. Недавнее успешное использование техники ядерного переноса на яйцеклетках приматов позволило получить потомство, унаследовавшее мтДНК от реципиентной яйцеклетки, а ядерную ДНК - исключительно от донора.

Одной из ближайших перспектив, определяющих дальнейшее развитие терапевтического клонирования, является создание банков замороженных незрелых яйцеклеток как исходного материала для техники ядерного переноса, поскольку источники свежих человеческих яйцеклеток крайне лимитированы. Необходимые методики криоконсервации с целью повышения выживаемости ооцитов и эмбрионов после размораживания отработаны в банках яйцеклеток сельскохозяйственных животных и, следовательно, могут быть использованы при организации криобанков человеческих клеток.

Биопринтинг – это управляемый компьютером автоматический процесс создания биоматериалов, частей биологической ткани и целых органов с использованием технологии печати. Технология биопринтинга позволяет собирать с высокой степенью точности ансамбли различных типов СК и иных компонентов ткани и биоинженерных каркасных конструкций

с целью искусственного воссоздания органа или ткани для последующей его пересадки в организм реципиента. В качестве первых биопринтерных устройств использовали обыкновенные струйные принтеры, картриджи которых вместо чернил заполняли суспензией клеток. В дальнейшем устройства для биопринтинга были усовершенствованы в так называемые 3D-биопринтеры, предназначенные для получения трехмерных биоинженерных тканевых конструкций, имитирующих сложную организацию биологических органов и тканей.



Биопринтинг сердца человека (<https://biolife4d.com/science-and-technology/>)

Эволюция развития технологии биопринтинга началась со сборки простейших дву- и трехмерных ансамблей (трубок, дисков, кубов, листов и т.д.) из стволовых и эмбриональных клеток, контролируемый рост и дифференцировка которых происходит в биореакторах. В биореакторах эмбриональные СК самопроизвольно образуют трехмерные агрегаты (так называемые эмбриоидные тела), внутри которых претерпевают дальнейшую дифференцировку. В дальнейшем из гомогенных клеточных агрегатов формируются гетерогенные за счет природного сродства определенных типов клеток друг к другу. Например, гладкомышечные клетки и фибробласты способны спонтанно образовывать смешанные сфероиды и микротрубки размером 300–500 мкм, из которых путем последовательного послойного биопринтинга можно вырастить микрососуды диаметром от 0,9 до 2,5 мм. Данное тканеспецифическое свойство клеток позволяет относительно просто и быстро получать простые модели искусственной кожи, хрящей и нервов, микрососуды и упрощенный костный мозг.

Тканевая инженерия и регенеративная медицина

Технологии тканевой инженерии могут быть перспективны при различных заболеваниях. Например, лечение сахарного диабета с помощью восстановления функций островков Лангенгарса или использование аутологичных клеток для регенерации мышц сердца при лечении ишемической болезни сердца, технологии регенерации нервов могут быть использованы для лечения инсульта. Сконструированные вакцины могут защищать от таких инфекционных заболеваний, как туберкулез, пневмония, ВИЧ/СПИД и диарея. Заменители кожи, включающие факторы роста, могут способствовать повторному росту тканей и их заживлению после травматического повреждения. Эти примеры указывают на возможности регенеративной медицины при лечении хронических, инфекционных и травматических заболеваний, и во многих случаях тканевая инженерия может быть более эффективной и доступной, чем существующие методы лечения заболеваний.

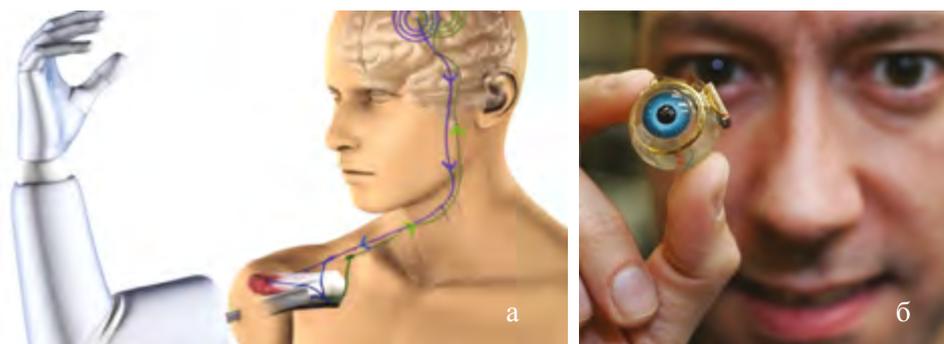
В случае травматических повреждений восполнение потери крови осуществляется путем переливания донорской крови. Этот способ достаточно дорогостоящий. Кроме того, необходимо проводить скрининговые мероприятия по исключению риска передачи вирусов. Современные биоматериалы, такие как тканеинженерные заменители кожи, могут свести к минимуму кровопотерю, уменьшить потребность в переливании крови и скрининге на наличие вирусов. При ишемической болезни сердца одним из методов лечения прогрессирующей сердечной недостаточности является трансплантация сердца. Клеточная биотерапия также будет технически намного проще, чем традиционная трансплантация. Кроме того, лечение биоматериалами на основе аутологичных клеток позволяет избежать иммунной реакции и применения дорогостоящих иммуносупрессивных схем. Методы лечения, обеспечиваемые тканевой инженерией, такие как микрокапсулированные клетки поджелудочной железы, могут длительно обеспечивать пациента инсулином. Новые биоматериалы для регенерации тканей могут стать более эффективным и доступным средством.

Создание искусственных органов (бионика)

Название «бионики» происходит от древнегреческого слова ($\beta\acute{\iota}\omicron\nu$ – «живущее»). Бионическая тканевая инженерия, или тканевая бионика, предназначена для разработки биоинженерных органов, частей органов и тканей, как можно более точно и полно имитирующих функции природных органов, с целью замены утраченных или нефункционирующих органов или регенеративного лечения ран. При создании эффективных бионических имплантов важен подбор оптимального состава и структуры биоматериалов, обеспечивающих успешное замещение функции утраченного органа или ткани. С целью достижения быстрой и полной регенерации ткани для быстрой активации имплантированных клеток используют ростовые

факторы. Важен также контроль и мониторинг приживления импланта, а также развитие местной воспалительной реакции в имплантированной ткани и возможности реакции отторжения импланта.

Для разработки крупных сложноорганизованных трехмерных структур, каковыми являются внутренние органы, прежде всего требуется решить проблему искусственной васкуляризации биоинженерного органа, представляющей собой сеть кровеносных сосудов различного калибра. Для решения данной проблемы следует решить ряд промежуточных задач, касающихся создания контактов между сосудами импланта и хозяина, роста сосудистого объема в соответствии с развитием ткани и предотвращения преждевременной или избыточной регрессии сосудов. Способность сосудистых сфероидов самоорганизовываться в ветвящиеся сосуды более крупного диаметра облегчает процесс создания искусственной кровеносной системы, что, в свою очередь, обеспечивает необходимые предпосылки на пути к созданию трехмерного искусственного органа. Предварительная васкуляризация биоинженерного органа в условиях *in vitro* существенно облегчает его последующее приживление в реципиентном организме и интеграцию искусственной сосудистой системы с кровеносной системой хозяина, что было показано при пересадке предварительно васкуляризованных искусственных скелетной и сердечной мышц.



Примеры бионических органов: рука (а), глаз (б)

Другая проблема, которую требуется решить при создании искусственного органа – это его иннервация, или создание сети искусственных нейронов, имитирующих периферическую нервную систему.

Задача создания искусственной нервной системы облегчается биологическим свойством нервных клеток спонтанно образовывать между собой межклеточные контакты на расстоянии до 6 мм. Конструирование искусственных нервных волокон требует применения особых электропроводящих биоматериалов для улучшения проведения нервного импульса. В настоящее время в тканевой нейроинженерии происходит испытание таких

токопроводящих материалов как нанофибриллы из полипиррола или полианилина, однако биосовместимость этих проводников требует дальнейших исследований.

После успешного приживления трансплантированных клеток важно отслеживать процессы ремоделирования имплантированной ткани, развитие и экспансию СК импланта в организме реципиента и умело направлять развитие клеток в сторону терминальной дифференцировки путем последовательного использования различных тканеспецифичных факторов дифференцировки. Для повышения регенеративного потенциала и устойчивости к цитотоксическому действию локального воспаления, ишемии и гипоксии в участке пересадки СК генетически модифицируют или, например, непосредственно перед пересадкой выдерживают в присутствии провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли- α или эстрадиола, что приводит к усилению выработки VEGF – важного ростового фактора, способствующего приживлению имплантированных СК при регенерации сердца и кровеносных сосудов.

Большое значение в создании бионического органа принадлежит математическому или компьютерному моделированию. На первом этапе строится математическое описание модели, разработка технических характеристик, проверка наличия интересующих практику свойств модели. На математической модели можно за короткое время обработать различные параметры и устранить конструктивные недостатки.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Важную роль в развитии персонализированной медицины сыграли разработки в области молекулярной биологии.

Молекулярная диагностика является ключевым методом при изучении персонализированных механизмов заболевания и эффективной терапии в будущем. Роль молекулярной диагностики в персонализированной медицине состоит в следующем:

- раннее выявление и выбор надлежащего лечения, признанного безопасным и эффективным;
- интеграция молекулярной диагностики с терапией;
- мониторинг результатов лечения, а также определение прогноза развития заболевания.

Молекулярная диагностика имеет большой потенциал для применения при генетическом скрининге больших популяций.

Блот-гибридизация ДНК по Саузерну

Методы молекулярной медицины были использованы для обнаружения гемоглобинопатий. Гены глобина были первыми идентифицированными и клонированными генами человека. Блот-гибридизация ДНК по Саузерну – один из классических методов молекулярной генетики, разработанный в 1970-х годах Эдвардом Саузерном, в честь которого и получил своё наименование. Метод позволяет определить наличие и некоторые характеристики целевой последовательности ДНК в составе сложной смеси (например, фрагментированной полногеномной ДНК). Меченые зонды кДНК глобина здоровых людей были гибридизованы путем Саузерн-блоттинга с геномной ДНК здоровых и больных людей, страдающих различными формами гемоглобинопатий. Это позволило идентифицировать специфические изменения в ДНК, связанные с этими заболеваниями.

Некоторые мутации, вызывающие заболевания, представляют собой рестрикцию или нарушения в определенном сайте ДНК, что позволяет диагностировать болезнь с помощью Саузерн-блоттинга. Например, диагностика серповидно-клеточной анемии, вызванной точковой мутацией в гене β -глобина, была впервые осуществлена в 1976 году. Эта мутация препятствует распознаванию сайта эндонуклеазы рестрикции *MstII*. Поэтому больные и «носители» этой мутации, не имеющие клинических проявлений заболевания, могут быть обнаружены благодаря наличию необычно длинных *MstII*фрагментов рестрикции. В другом случае один или более рестрикционных фрагментов может отсутствовать, что встречается также

при ряде других заболеваний, связанных с мутациями, приводящими к нарушениям в сайтах эндонуклеазной рестрикции, например, при талассемии.

История развития представлена об этом заболевании и подходов к его диагностике и лечению являются иллюстрацией использования достижений фундаментальных наук в практическом здравоохранении. Первое описание этого заболевания относится к 1925 году, когда Кули предположил, что повреждение красных кровяных телец человека является наследственным. К концу 1960-х годов было показано, что это заболевание вызвано нарушением синтеза двух глобиновых белков, α -глобина и β -глобина, при котором меняется их соотношение, в норме составляющее 1. Нарушение продукции одного из белков вызывает, соответственно, α - и β -талассемию. Существуют люди, у которых наличие генетического дефекта не приводит в течение длительного времени к возникновению выраженных клинических симптомов. В 1976 году это заболевание впервые было диагностировано методами молекулярной медицины (жидкостная гибридизационная техника), при этом использовалась пренатальная диагностика. Мутационный анализ талассемии развивался по двум направлениям: определение делеций, связанных с α -талассемией и обнаружение точковых мутаций, вызывающих β -талассемию. До эпохи ПЦР-диагностики многочисленные точковые мутации не удалось охарактеризовать, и исследователи применяли непрямую ДНК-диагностику с использованием полиморфных ДНК.

До изобретения ПЦР метод блот-гибридации ДНК был одним из основных инструментов изучения генов и геномов, а также ДНК-диагностики. В настоящее время ПЦР, позволяющая быстро и эффективно амплифицировать последовательности ДНК протяженностью до нескольких тысяч пар оснований, практически вытеснила блот-гибридизацию из клиниче-



Схема блот-гибридации ДНК по Саузерну

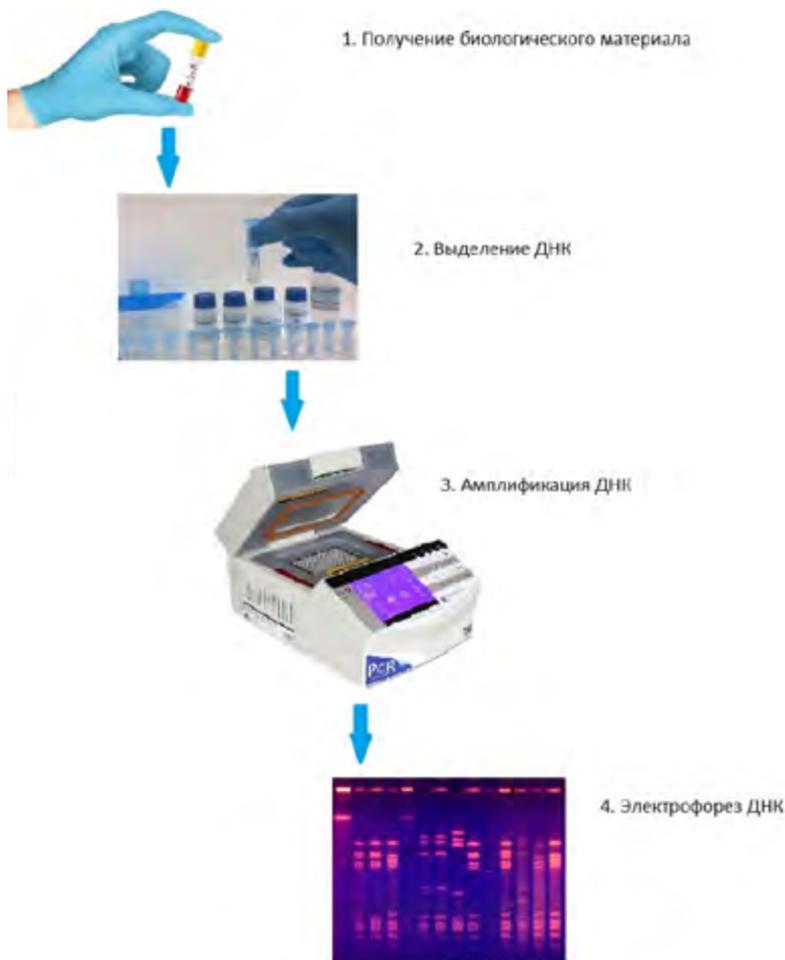
ской лабораторной диагностики. ПЦР значительно проще в исполнении, дешевле, оперативнее, экологичнее (в этом отношении особенно важен отказ от использования радиоактивных изотопов). Кроме того, для проведения ПЦР достаточно нескольких копий исходной матрицы, в то время как блот-гибридизационный анализ успешен лишь при наличии весьма значительных количеств анализируемой ДНК (порядка 10 мкг).

Тем не менее, в современной лабораторной диагностике метод блот-гибридизации сохранил за собой определенное, хотя и не столь важное, как прежде, место. Это ниша, не занятая ПЦР в силу того, что полимеразная цепная реакция имеет ограничения по длине амплифицируемого фрагмента ДНК и особенностям его нуклеотидного состава (например, процентного содержания пар С-Г, повторяемости структуры анализируемого участка генома). В значительной степени это имеет отношение к ДНК-диагностике ряда болезней и экспансии микросателлитных повторов. Аллели генов с экспансией С,Г-обогащенных повторов, достигающих длины в десятки тысяч нуклеотидов (например, при миотонической дистрофии, спиноцереbellарной атаксии 10-го типа), до сих пор детектируются только методом блот-гибридизации по Саузерну.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для выявления точковых мутаций, небольших делеций и инсерций в исследуемых генах используется множество различных подходов, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря которому возможно многократно увеличить уникальную последовательность ДНК, а затем проанализировать ее на наличие или отсутствие мутации в исследуемом локусе.

История открытия метода ПЦР относится к 70-м годам XX века, когда норвежский учёный Хьелль Клеппе предложил способ амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК – синтетических праймеров (короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, комплементарный ДНК- мишени, служит затравкой для удвоения цепи ДНК). Однако в то время эта идея осталась нереализованной. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была изобретена в 1983 году американским биохимиком Кэри Муллисом. Он создал метод многократных последовательных удвоений ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Метод революционизировал молекулярную биологию и медицину. В 1993 году Кэри Муллис получил за это Нобелевскую премию по химии. Работа с ДНК-полимеразой была неэффективной, она требовала много времени и фермента, т.к. после каждого цикла нагревания (в этот момент расходились нити ДНК) приходилось охлаждать инкубационную смесь (ДНК-полимераза работала в условиях 37°C). В 1986 году метод полимеразной цепной реакции был существенно улучшен. Было предложено использовать ДНК-полимеразы

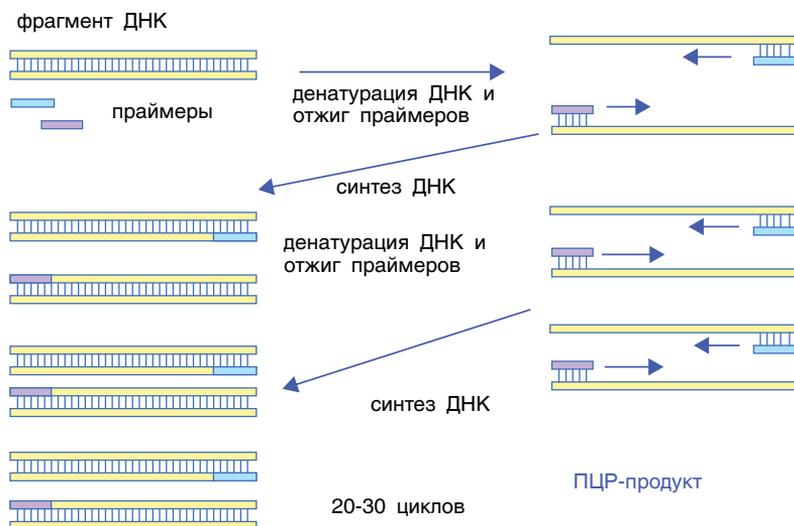


Этапы проведения ПЦР-анализа

из термофильных бактерий. Эти ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа *Taq*-полимеразой.

ПЦР проводят в амплификаторе – приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшетов, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20–35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий: денатурация ДНК, отжиг (присоединение специфических праймеров к нитям ДНК), элонгация (удвоение нитей ДНК).



Принцип метода ПЦР

Продукты амплификации являются объектами дальнейшего поиска мутаций с помощью ряда методов, позволяющих выявлять небольшие структурные изменения.

Прежде всего можно обнаружить мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов ДНК, так как подобные нарушения легко выявляются при электрофоретическом анализе. При этом важным является то, что клинические симптомы заболевания могут отсутствовать. Наследственные нарушения могут определяться пренатально, а болезнь Хантингтона, например, и до начала ее манифестации. ПЦР-тесты позволяют также определять небольшие количества возбудителя инфекции, а клетки злокачественной опухоли до начала морфологически и симптоматически определяемой стадии развития болезни. Эта методика оказывается полезной и для скрининга крови и ее отдельных составляющих при латентных заболеваниях типа ВИЧ-инфекции. Именно разработка ПЦР позволила широко использовать в России диагностику ВИЧ и ряда других вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций с целью выявления латентных форм и предотвращения их распространения в масштабах страны. Важным преимуществом этих методов является их скорость, что может обеспечить успех лечения в случае острых инфекционных заболеваний.

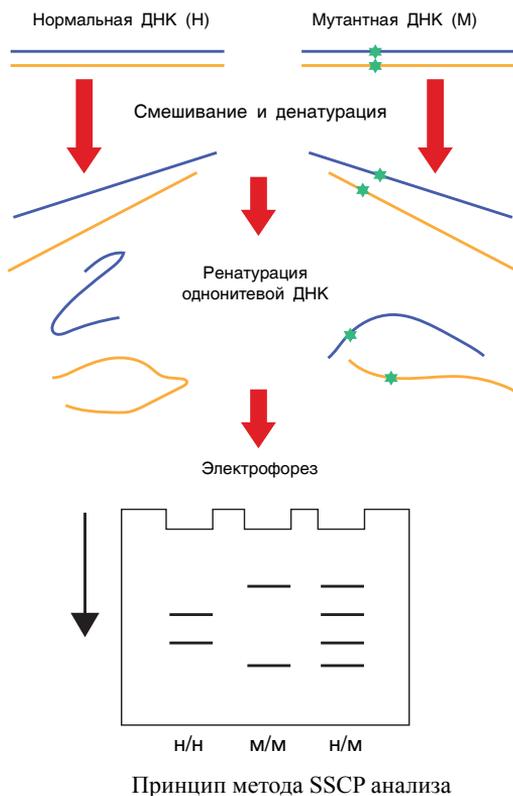
Методом ПЦР можно выявлять делеции и вставки, изменяющие размеры исследуемого участка ДНК. С помощью этого метода диагностируются

микроделеции Y-хромосомы, делеции при мышечной дистрофии Дюшенна и Беккера и др.

При мутациях гена, представляющих собой замену даже одного нуклеотида, длина амплифицированных фрагментов остаётся постоянной, однако некоторые свойства (физические, химические и т.д.) мутантных молекул меняются. С учетом этих особенностей разработаны различные варианты поиска мутантных фрагментов ДНК и идентификации в них точковых мутаций.

Ведущими и наиболее часто применяемыми в молекулярно-генетических исследованиях, являются следующие методы: метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP), метод анализа гетеродуплексов (HDA), денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) и различные автоматизированные аналоги этих и других методов.

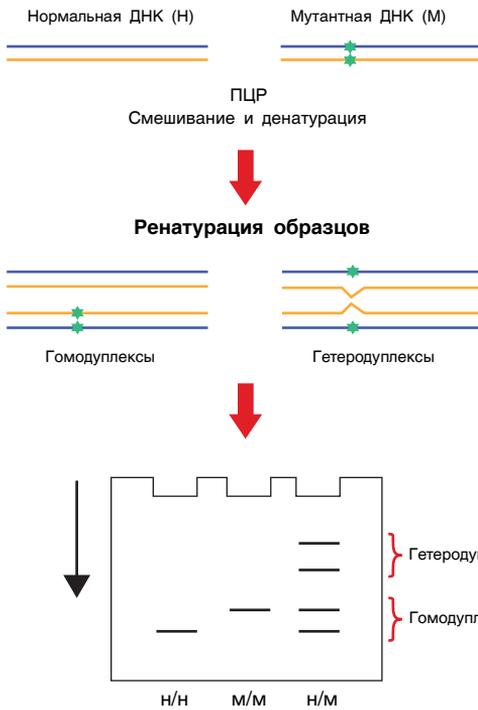
Для оценки генных полиморфизмов широко используется метод SSCP (single strand conformation polymorphism), основанный на анализе конформационного полиморфизма однонитевой ДНК. Этот метод был предложен в 1989 году и в настоящее время является одним из наиболее простых в исполнении высокочувствительных методов поиска однонуклеотидных замен в исследуемом участке геномной ДНК. Метод основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности одноцепочечных фрагментов ДНК после амплификации, одинаковых по величине, но различающихся вследствие нуклеотидных замен по пространственной организации молекул. Конформация и, соответственно, различие в подвижности небольших однонитевых фрагментов ДНК зависят от нуклеотидной последовательности, определяющей характер вторичных и третичных структур, и поэтому замена даже одного нуклеотида приводит к изменению пространственной структуры. Конформация однонитевой ДНК определяется слабыми стабилизирующими силами (внутриспиральными парными взаимодействиями), которые зависят от последовательности ну-



клеотидов, составляющих фрагмент ДНК. Поэтому возможна регистрация различий в электрофоретической подвижности фрагментов ДНК, различающихся даже по одному нуклеотиду. Этот факт позволяет визуализировать и идентифицировать фрагменты ДНК с минимальными различиями нуклеотидного состава.

SSCP-анализ получил широкое распространение вследствие относительной простоты, эффективности и возможности обнаруживать любые типы замен. Метод применяют для прямой диагностики новых мутаций при тестировании большого количества проб, соответствующих экзонам крупного гена и/или полученных от большого числа пациентов. Единственное ограничение применения метода – величина исследуемого участка ДНК. Оптимальным размером фрагмента ДНК является длина в 200–250 п.н., при этом

эффективность детекции мутаций составляет 80–90%.

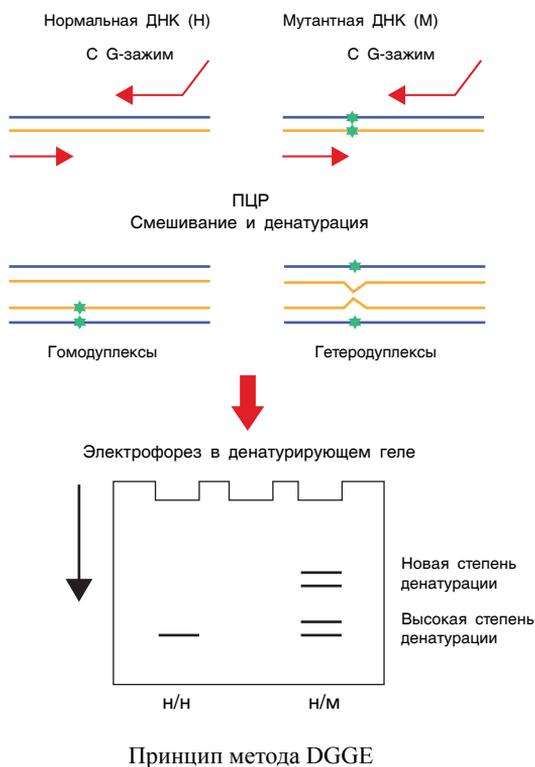


Принцип метода анализа гетеродуплексов

полученных продуктов ПЦР в амплификационной смеси наряду с двумя типами гомодуплексов образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепями ДНК. Электрофоретическая подвижность гетеродуплексов значительно ниже, чем гомодуплексов. Любые несоответствия в гетеродуплексе приведут к тому, что фрагмент ДНК будет формировать структуру с пониженной степенью подвижности, пропорциональной степени дивергенции последовательностей.

Метод анализа гетеродуплексов – HDA (heteroduplex analysis) – позволяет выявлять мутации, находящиеся в гетерозиготном состоянии, а также небольшие инсерции и делеции. Принцип метода заключается в том, что электрофоретическая подвижность гетеродуплексов, образующихся при комплиментарном взаимодействии мутантной и нормальной ДНК отличается от подвижности гомодуплексов нормальных фрагментов ДНК за счет конформационных особенностей в местах несовпадения нуклеотидов. При амплификации фрагментов генов с мутациями в гетерозиготном состоянии, последующей денатурации и медленной ренатурации

Метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза – DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) заключается в анализе амплифицированной с помощью ПЦР двухцепочечной ДНК в градиенте денатурирующего агента. Метод основан на зависимости свойств денатурации небольших двунитевых молекул ДНК от их нуклеотидной последовательности, а точнее, от соотношения А-Т и G-С пар в амплифицированных фрагментах. Объясняется это более прочной связью G-С по сравнению с А-Т связью. Различия в динамике плавления могут быть выявлены при электрофорезе в денатурирующих условиях нормальных и мутантных двунитевых фрагментов ДНК.



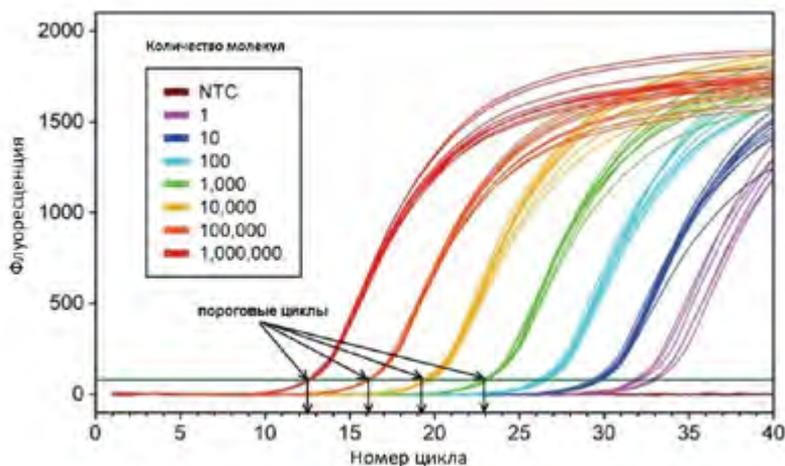
Градиент денатурации достигается различной концентрацией денатурирующих агентов (мочевины или формальдегида) в гелях. При этих условиях одинаковые по длине, но отличающиеся по нуклеотидному составу молекулы ДНК денатурируют по-разному. Миграция фрагментов продолжается до тех пор, пока ДНК-дуплексы не достигают точки плавления и не разделяются. После начала плавления миграция двухнитевых фрагментов ДНК в геле резко замедляется из-за сложной пространственной конфигурации молекул, причем эта задержка будет происходить до полной денатурации ДНК и остановки продвижения фрагментов. В результате происходит разделение фрагментов ДНК. Поскольку при прохождении ДНК через гель может начаться частичная денатурация концов молекулы еще до достижения оптимальной области плавления, мутации, локализованные вблизи концов амплифицированных фрагментов, могут быть не выявлены. Для предотвращения преждевременной денатурации концов молекул ДНК до достижения оптимальной области плавления, обусловленной определенным нуклеотидным составом фрагмента, к концам молекул ДНК присоединяют так называемые G-С-зажимы (синтетические фрагменты из G-С-нуклеотидов размером в несколько десятков нуклеотидов). Образованные таким образом тугоплавкие концы ПЦР-продукта выполняют роль своеобразных зажимов и снижают вероятность преждевременной денатурации,

а также увеличивают степень обнаружения всех мутаций, в том числе и локализованных вблизи концов амплифицированных фрагментов ДНК.

В отличие от SSCP-анализа, метод DGGE пригоден для тестирования более протяженных участков ДНК и позволяет определять различия в подвижности фрагментов размером до 800–1000 п.н. с чувствительностью около 95%. Однако, к недостаткам этого метода следует отнести техническую сложность получения равномерного градиента денатурирующего агента в геле и увеличенную стоимость олигонуклеотидных праймеров за счет синтеза GC-затвора. Из-за некоторой сложности стандартизации чувствительность метода может несколько снижаться.

Развитие молекулярных технологий делает возможности молекулярной диагностики практически безграничными. Сегодня уже невозможно представить лабораторную диагностику без полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также современных модификаций ПЦР, таких как ПЦР в реальном времени (Real time PCR), высокоразрешающего анализа плавления продуктов ПЦР (High resolution melting – HRM), метода мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification – MLPA), цифровой ПЦР (Digital PCR).

Появление технологий ПЦР в реальном времени вдохнуло новую жизнь в методику ПЦР. Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременную детекцию с помощью флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зондов и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце.



Результат проведения ПЦР в реальном времени

При постановке ПЦР в реальном времени используются те же принципы, что и при обычном ПЦР. Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с обратной транскриптазной реакцией ОТ-ПЦР для измерения малых

количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании данной мРНК в клетке и, соответственно, позволяет судить об уровне экспрессии данного гена в отдельной клетке или ткани.

ПЦР в реальном времени также перспективно для обнаружения мутаций. В этом случае используются три праймера, один из которых распознает мутантный аллель, другой – специфичен для нормальной последовательности, а третий является общим. Как правило, аллель-специфические праймеры отличаются друг от друга лишь по одной позиции на 5'-конце. Подобные подходы существовали уже давно, однако «традиционная» ПЦР не давала возможность надежной детекции мутаций, поскольку результаты расценивались по окончанию реакции, когда начальные различия в кинетике амплификации аллелей уже стираются. Техническая простота и невысокая стоимость аллель-специфической ПЦР в реальном времени определяют её широкое использование для детекции мутаций. Подобные подходы существовали уже давно, однако «традиционная» ПЦР не давала возможность надежной детекции мутаций, поскольку результаты расценивались по окончанию реакции, когда начальные различия в кинетике амплификации аллелей уже стираются. Техническая простота и невысокая стоимость аллель-специфической ПЦР в реальном времени определяют её широкое использование для детекции мутаций. Однако, независимо от метода детекции мутации, точные молекулярные характеристики каждой мутации могут быть получены только путем прямого секвенирования изучаемой нуклеотидной последовательности.

Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК, т.е. определение их нуклеотидной последовательности (от лат. *Sequentum* – последовательность), первоначально использовалось только в исследовательских целях, но теперь стало обычным инструментом молекулярной диагностики. Принцип этого метода был разработан Ф. Сэнгером в конце 1970-х годов, а в 1980 г. он получил за это Нобелевскую премию.

В основе этого метода лежал принцип построения комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах цепи ДНК ингибировании ее дальнейшего синтеза. Ключевым моментом этого процесса являлась терминация построения комплементарной цепи ДНК, происходящая при включении ДНК-полимеразой модифицированных аналогов природных субстратов – дидезоксинуклеотид трифосфатов (ddNTP). Отсутствие второго гидроксильного остатка в 3'-положении рибозного кольца у дидезоксипроизводных приводила к невозможности присоединения к ним следующего нуклеотида, и рост цепи прерывался. В результате образуется большое число фрагментов ДНК, отличающихся по длине на один нуклеотид.

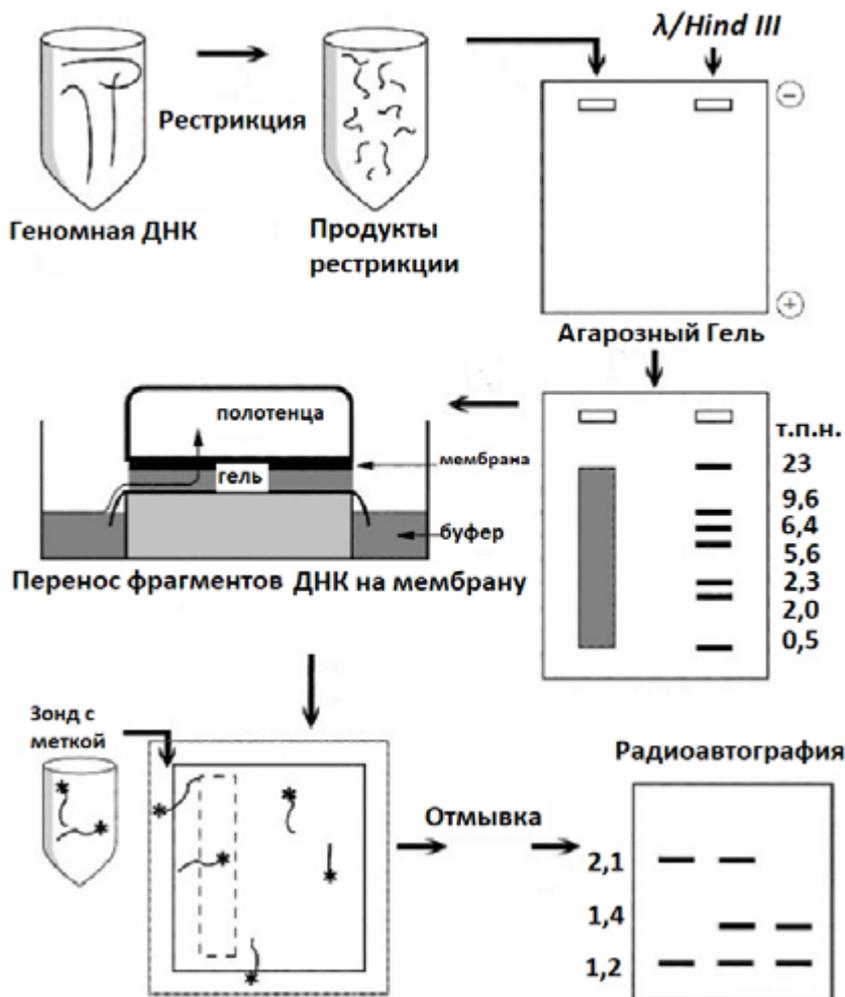


Схема метода гибридизации ДНК по Саузеру. $\lambda/Hind III$ – образец ДНК фага λ , гидролизованный рестриктазой $Hind III$; используется как маркер молекулярной массы ДНК.

Затем продукты терминирования подвергались денатурации и уже одностранные меченые фрагменты разделялись по длине высоковольтным электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ), позволяющем разделять фрагменты ДНК, отличающиеся по длине всего на один нуклеотид, в четырех соседних дорожках, соответствующих определенным терминирующим реакциям (А, Т, G, С). По завершении электрофореза гель экспонировали на рентгеновскую пленку, и по прошествии 1–2 суток с проявленной пленки можно было «читать» последовательность нуклеотидов секвенируемого участка ДНК, начиная с нижней части геля и последовательно поднимаясь вверх по этим четырем дорожкам, соответствующим одному фрагменту ДНК.

Оригинальный метод секвенирования по Сэнгеру широко использовался в лабораториях около 10–15 лет благодаря своей простоте и эффективности по сравнению с имеющимися в 80–90 гг. XX века аналогами, например, методом секвенирования путем химической дегградации цепей ДНК, известным как метод Максама-Гилберта. Тем не менее, к середине 1990 гг. стали очевидны недостатки метода, не позволяющие ему решать все более масштабные задачи в рамках проекта «Геном человека»: радиоактивное мечение и связанные с ним повышенные требования к биобезопасности работ, относительно короткая длина читаемого фрагмента на геле, большое количество экспериментальной работы, выполняемой вручную. Эти и некоторые другие особенности оригинальной методики секвенирования по Сэнгеру не позволяли достичь необходимой производительности секвенирования, метод нуждался в развитии и автоматизации.

Работа с целью автоматизации метода секвенирования по Сэнгеру велась одновременно во многих направлениях большим количеством исследователей как в научных учреждениях, так и в отделах исследований и разработок крупных биотехнологических компаний. Во-первых, радиоактивное мечение было заменено комбинацией флуоресцентных красителей, что сняло проблему хранения и утилизации радиоактивных материалов, позволило увеличить чувствительность регистрации меченых фрагментов (теперь для секвенирования требуется меньше матрицы), увеличить количество тестируемых образцов (1 канал вместо 4 при секвенировании одного образца). Во-вторых, вместо электрофореза в ПААГ, который позволял секвенировать 100–200 п.н. в нескольких образцах, был разработан высоковольтный капиллярный электрофорез с использованием жидкого линейного полимера и ступенчатого повышения напряжения. Это позволило быстро менять полимер в капиллярах после каждого рабочего цикла и увеличить длину читаемого участка матрицы до 1000 п.н.

Современные капиллярные секвенаторы могут за один рабочий цикл анализировать от 16 образцов до полностью заполненной 96-луночной плашки (3100 Genetic Analyzer и 3730xl DNA Analyzer, “Applied Biosystems”, соответственно). Наконец, все этапы электрофореза и анализ данных, начиная от электрокинетической инъекции до формирования файла с хроматограммой секвенированной последовательности, осуществляются в едином программно-аппаратном комплексе под управлением компьютера, что существенно снижает вероятность ошибок экспериментатора на отдельных этапах работы. Помимо необходимого программного обеспечения для секвенирования, компании-производители предлагают дополнительные программы, позволяющие проводить сравнение секвенированной последовательности с последовательностью генома человека в международных базах данных, идентифицировать мутации, определять изменения на уровне полипептидной цепи, к которым приводят обнаруженные мутации (например, программа SeqScape® Software v. 2.7, “Applied Biosystems”).

Разработки конца 1990 – начала 2000 гг. привели к автоматизации и многократному увеличению надежности и производительности секвенирования по Сэнгеру, которое проводится в настоящее время только с помощью капиллярных генетических анализаторов. В конце 2000-х гг. в мире определились две лидирующие компании, которые производят автоматические капиллярные секвенаторы – Applied Biosystems и Beckman Coulter.

Идентификация мутаций методом секвенирования ПЦР-продуктов включает ряд последовательных стадий: выделение ДНК, ПЦР, очистку ПЦР-продукта, мечение, пробоподготовку и анализ на секвенаторе, сопоставление полученных данных с международными базами данных последовательностей генома человека, идентификация мутации. В большинстве диагностических протоколов длина ПЦР-продуктов находится в пределах 100–700 п.н., что позволяет секвенировать амплифицируемую последовательность за один рабочий цикл капиллярного анализатора с использованием праймеров, предназначенных для ПЦР. При этом целесообразно секвенировать ПЦР-продукт дважды – отдельно каждую цепочку ДНК с прямого и обратного праймеров, соответственно. Это способствует уменьшению вероятности ошибки при прочтении нуклеотидной последовательности и исключает ситуацию, когда прилегающий непосредственно к праймеру участок ПЦР-продукта не будет секвенирован из-за отклонений от оптимальных соотношений компонентов реакционной смеси при элонгации.

В рутинной ДНК-диагностике секвенирование, в основном, применяют для поиска мутаций в генах-кандидатах при подозрении на то или иное наследственное заболевание.

Развитие методов молекулярной генетики идет все возрастающими темпами, серьезный прорыв в направлении полногеномного секвенирования произошел, когда оригинальные технологические решения и новое оборудование, реализуемые ведущими биотехнологическими компаниями, были представлены на рынке. Практически одновременно рядом компаний были представлены новые платформы ДНК-секвенирования, основанные на различных химических принципах и схемах детекции сигнала. Они получили общее название «секвенаторы следующего поколения» (англ. next-generation sequencing, сокр. NGS), однако совершенствование шло такими быстрыми темпами, что очень быстро появился новый собирательный термин – «высокопроизводительное секвенирование» (англ. high-throughput sequencing). Наиболее известные компании – производители – Roche, Illumina, Life Technologies, Ion Torrent, Pacific Biosciences. Это различные технологии полногеномного секвенирования, обладающие высокой производительностью и низкой стоимостью, стоимость секвенса генома одного человека равна приблизительно 1000 долларов США. Несмотря на большое количество производителей оборудования для высокопроизводительного секвенса нельзя выделить какую-либо одну технологию в качестве оптимальной; каждая платформа обладает своими плюсами и минусами, в т.ч. специфичным профилем ошибок.

Биочипы

Биочип – это собирательный термин, указывающий на использование технологии микрочипов в молекулярной биологии. Биочипы представляют собой матрицу с нанесенными на ее поверхность различными биологическими молекулами: нуклеиновые кислоты, белки, биоструктуры. Биологические микрочипы широко используются в *in vitro* диагностике. В основе механизма действия биочипов лежит молекулярное распознавание анализируемых молекул молекулами – биополимерами, нанесенными на чип. Это распознавание построено либо на взаимодействии рецепторов с лигандами (например, антител с антигенами), либо на гибридизации комплементарных цепей ДНК. В частности, разработаны биочипы, распознающие короткие олигонуклеотидные последовательности и позволяющие детектировать единичные мутации в генах.

ДНК-микрочипы

ДНК-микрочип представляет собой небольшую пластинку с сотнями микроскопических ячеек, в которых прикреплена зондовая ДНК к мутантным и нормальным аллелям разных генов, представленная одной нитью дезоксирибонуклеотидов в количестве примерно 20 штук. ДНК пациента после ПЦР метят флуоресцентным красителем и наносят на микрочип. В случае обнаружения мутации происходит гибридизация ДНК пациента с ДНК – зондом, и ячейка микрочипа начинает светиться.

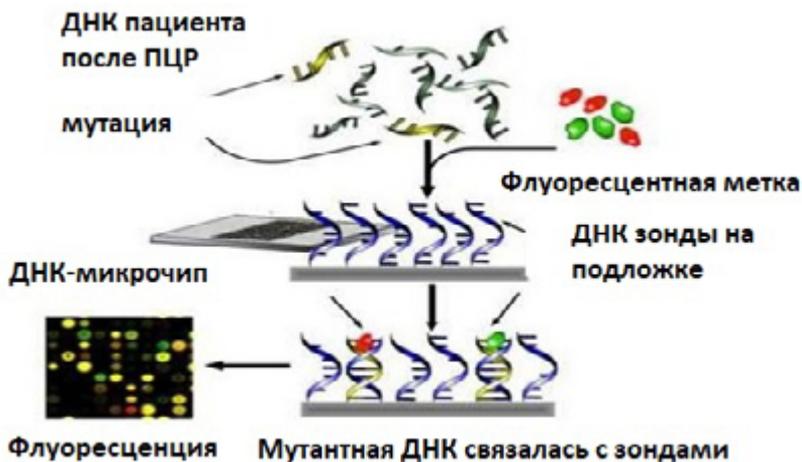
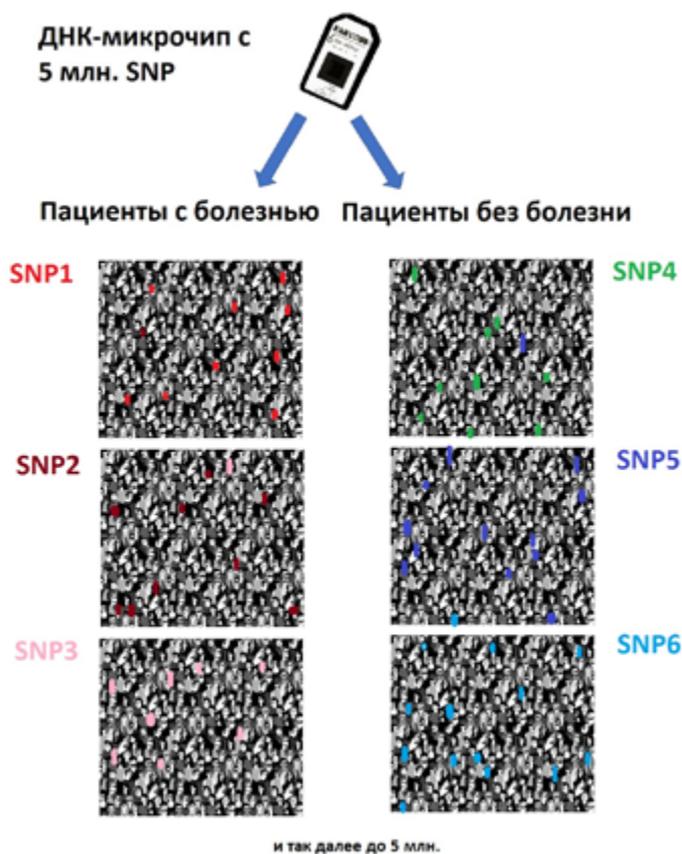


Схема метода с использованием ДНК-микрочипа

В последние 20 лет активно развиваются технологии с высоким разрешением, основанные на микрочипах GWAS (Genome – Wide Association Studies – полногеномный поиск ассоциаций). Эта технология рассматрива-

ется многими исследователями как наиболее производительный подход к полногеномному секвенированию и анализу генов, в частности выявлению SNP. Выявление SNP является основой для развития персонализированной медицины.

В настоящее время наиболее перспективным методом анализа SNP является гибридизация на микрочипах. Указанный подход позволяет одновременно анализировать десятки и даже сотни тысяч SNP и/или большие выборки. Микрочипы для анализа SNP всё чаще используются для исследования генома человека: построения генетических карт высокого разрешения, ассоциаций тех или иных локусов с определенными заболеваниями, аллель-специфической экспрессии, изменений количества копий участков генома в опухолевых клетках и т.д. Однако микрочипы и оборудование для проведения таких экспериментов пока остаются дорогостоящими, поэтому генотипирование SNP с помощью микрочипов проводится, как правило, в крупных исследовательских центрах для решения фундаментальных научных проблем или актуальных задач биомедицины.



Принцип работы ДНК-микрочипа

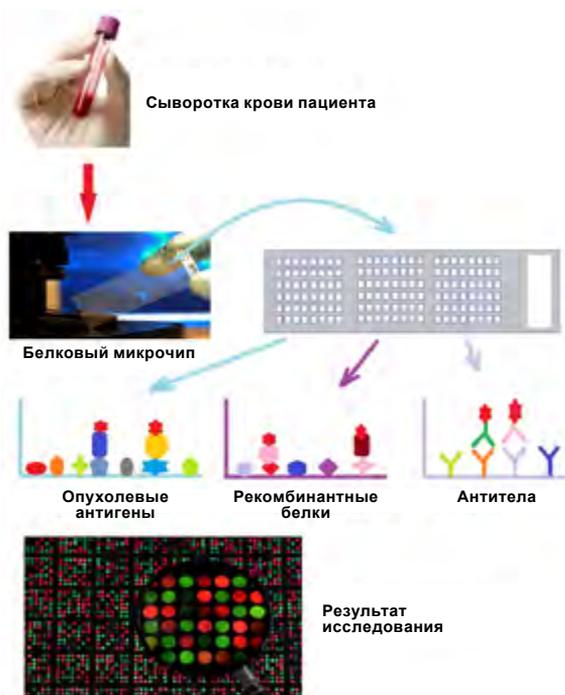
Области применения ДНК-микрочиповых технологий относятся к персонифицированным технологиям. Микрочипы позволяют ученым одновременно наблюдать очень тонкие изменения во многих генах. Они выявляют разную экспрессию генов в здоровых и больных клетках, данный подход может быть использован в транскриптомике для разработки персонализированных методов лечения.

Микрочиповые технологии не только помогают понять огромное количество геномной информации, но также адаптируют ее применение к пациенту путем раннего обнаружения болезни и прогнозирования лекарственной реакции.

Белковые биочипы

Чаще всего в качестве информационных молекул в молекулярной диагностике используются нуклеиновые кислоты, но белковые чипы также могут быть полезными. Определение профиля белков остаётся важным при сравнении нормальных и патологически изменённых клеток. Белковые чипы дают возможность разработки быстрого глобального анализа всего протеома для диагностики и терапии. Технология белкового чипа подразумевает использование в качестве зондовой молекулы белковых молекул, антител и др. Для сохранения целостной структуры белковой молекулы белок иммобилизован в матриксе.

Молекулы пациента метятся люминисцентно, и в случае взаимодействия с белком-зондом наблюдается свечение. Белковые биочипы являются одним из методов протеомного анализа. Протеомный анализ может использоваться как инструмент для скрининга при онкологических заболеваниях в группах высокого риска, выявления аутоиммунных заболеваний путем скрининга сыворотки крови пациентов или лиц высокого риска на наличие специфических аутоантител. Однако, платформенные технологии для анализа большого количе-



Принцип работы белкового микрочипа

ства протеомных данных еще недостаточно развиты, их предстоит разработать и сделать доступными.

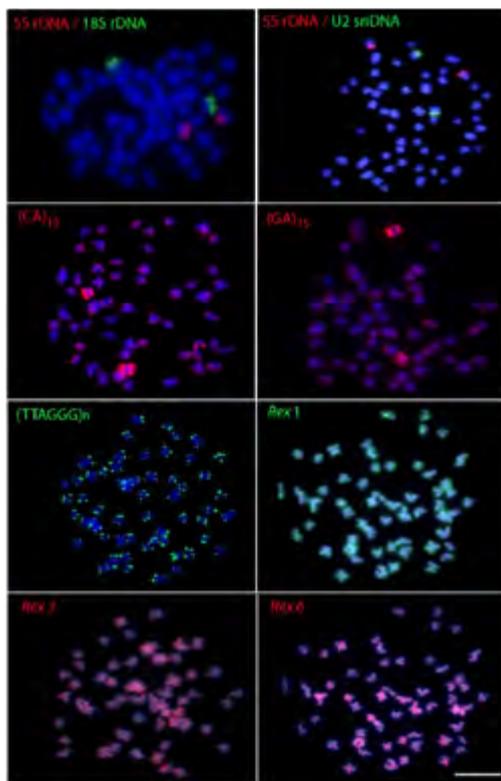
Цитогенетика

Термин «цитогенетика» первоначально использовался, главным образом, для описания структуры хромосом и выявления отклонений, связанных с заболеванием. Сегодня, помимо клинической диагностики, цитогенетика используется также для фундаментальных геномных исследований. Поэтому цитогенетику ещё называют «цитомикой», что подразумевает молекулярно-клеточный фенотипический анализ тканей и органов с одновременным получением информации о структуре и функции объекта использования.

Благодаря цитомике можно провести на уровне одиночной клетки анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов (геномика, протеомика и метаболомика), а также параметров, характеризующих функционирование клеток (внутриклеточный pH, трансмембранные потенциалы или градиенты ионов). Поэтому появились такие термины, как цитогеномика, цитомета-

таболомика и цитопротеомика. Из-за важной роли в диагностике заболеваний на молекулярном уровне цитогенетика может называться «молекулярной цитогенетикой».

Достижения в области флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) повышают значимость цитогенетики как в фундаментальных исследованиях, так и в молекулярной диагностике. Цитогенетический анализ в настоящее время выходит за рамки простого описания хромосомного статуса и позволяет изучать фундаментальные основы механизмов развития заболеваний, таких как природа наследственных синдромов, геномные нарушения, приводящие к онкологическим заболеваниям и 3D организации генома человека. Применение высокого разрешения размывает традиционные



FISH диагностика мутаций

различия между цитогенетикой и молекулярной биологией. Классическая цитогенетика эволюционировала от черно-белых до цветных изображений хромосом. FISH-диагностика мутаций флуоресцентных белков в настоящее время называется молекулярной цитогенетикой. Молекулярная цитогенетика позволит в дальнейшем оценить молекулярные основы структурных хромосомных аномалий.

Для лабораторной диагностики генетических мутаций используют разнообразные методы цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, комплексное применение которых позволяет установить локализацию и характер генетического дефекта.

Современные подходы в клинической цитогенетике представляют собой комплекс высокоразрешающих методов хромосомного анализа, клеточной и молекулярной биологии. Они позволяют не только решать проблемы диагностики и характеристики той или иной хромосомной патологии, но и определять местоположение генетической мутации на хромосоме. С помощью современных методов можно проводить тонкое генетическое картирование, изучать структуру гена, характеризовать спектр его мутаций и на этой основе разрабатывать эффективные ДНК-диагностические процедуры.

Тонкие структурные перестройки, представленные микроделециями, микродупликациями, парацентрическими инверсиями, небольшими транслокациями равных по величине участков, не обнаруженные на метафазных хромосомах при кариотипическом исследовании, были выявлены с помощью молекулярно-цитогенетических методов, обладающих высокими разрешениями.

Благодаря использованию цитогенетических методов с высокой разрешающей способностью удалось выделить целую группу заболеваний, сопровождающихся микрохромосомными аномалиями, таких как синдромы Прадера-Вилли, Ангельмана, Видеманна-Беквита, Миллера-Дикера и др. Эти заболевания можно отнести к большой группе генетических заболеваний, так называемых микроделеционных синдромов.

Транскриптомные технологии

Транскриптомный анализ, то есть анализ всех типов РНК биологического объекта, используется для решения многих задач, таких как каталогизация мРНК в клетке, определение локализации участков начала транскрипции, количественный анализ уровня транскриптов на различных стадиях развития клетки и при определённых физиологических или патологических условиях. Транскриптомика располагает мощным потенциалом полногеномного анализа на высокоплотных РНК-чипах. Преимуществом транскриптомного анализа для исследования индуцирован-

ной дифференцировки является возможность регистрации и определения уровня экспрессии транскриптов, соответствующие белковые продукты которых содержатся в клетке в очень малом количестве, и их обнаружение протеомными методами не всегда представляется возможным.

Транскриптомный анализ позволяет зарегистрировать поведение генов немедленного ответа непосредственно после добавления индуктора. Экспрессия таких генов может сильно изменяться, что не отражается на уровне белков вследствие низкой скорости трансляции, поэтому протеомные методы не могут зарегистрировать произошедшие изменения. Поскольку транскриптомное профилирование предоставляет информацию об экспрессии всех генов клетки, транскриптомные данные используются в биоинформационных исследованиях для поиска сигнальных путей и построения интерактивных моделей. Недостатком транскриптомных методов можно считать невозможность получения информации как об эффективности трансляции, так и о посттрансляционных модификациях соответствующих белковых продуктов. Уровень экспрессии мРНК часто плохо коррелирует с уровнем содержания соответствующего белка, что может быть обусловлено альтернативным сплайсингом, разной скоростью трансляции и деградации мРНК и белков. Наконец, фенотипические особенности клеток, напрямую связанные с выполнением функций в организме, определяются, прежде всего, качественным составом и уровнем содержания белков, для изучения которых используются протеомные методы.

Существует несколько распространенных методов для широкомасштабного исследования транскриптома – «серийный анализ экспрессии генов» – Serial analysis of gene expression (SAGE), «прочитанные фрагменты экспрессированных последовательностей» – Expressed Sequence Tags (ESTs), «Массовое одновременное секвенирование характерных фрагментов» – Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS).

Однако в настоящее время только метод ДНК-биочипов, или ДНК-микроматриц (DNA microarray, DNA biochip, oligonucleotide microarray, cDNA microarray), является средством общегеномного и высокопродуктивного исследования транскриптома.

Протеомные технологии

Анализ протеома – анализ всех белков клетки, ткани или другого биологического объекта – направлен на определение качественного и количественного состава той или иной смеси белков. Изменение концентрации и состава белков имеет большое значение для определения статуса биологической системы, признаков нарушения её нормального физиологического состояния под действием химических или физических факторов. Протеомика обычно относится к крупномасштабному эксперимен-

тальному анализу белков и опирается на три основных методологических краеугольных камня:

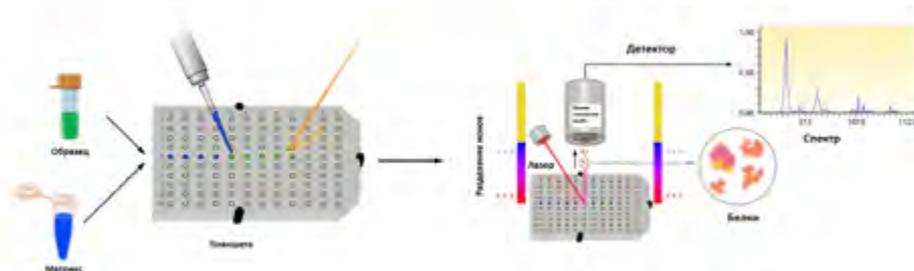
- способ фракционирования сложных белковых или пептидных смесей;
- масс-спектрометрия для идентификации отдельных белков;
- биоинформатика для анализа и сбора данных.

Фракционирование белков проводят с помощью двухмерного (2D)-гель электрофореза, который разделяет белки по двум направлениям в специальном носителе – геле: в одном направлении разделяются молекулы белка по молекулярной массе, в другом – по суммарному электрическому заряду. В результате этой процедуры группируются одинаковые молекулы, которые окрашиваются специальным красителем с появлением пятен, содержащих только один вид белка. Таким образом осуществляется визуализация различных белков, при этом размер пятна соответствует количеству белка. Число пятен, т.е. число разных белков или пептидов, может составлять многие тысячи, для дальнейшего анализа белков осуществляют их выделение и определение структуры с помощью масс-спектрометра.

Масс-спектрометрия – это технология, которая совершила революцию в протеомике. Причинами этого являются высокое разрешение для сложных белков и высокая чувствительность, которые позволяют идентифицировать белки в концентрации от 10^{-15} до 10^{-18} моль и дают возможность получения информации о сотнях молекул одновременно. С помощью масс-спектрометрии возможна идентификация первичной структуры белка, в том числе его посттрансляционные модификации. Кроме того, масс-спектрометрия позволяет определять абсолютное или относительное количество белка. Наконец, масс-спектрометрическая протеомика хорошо подходит для картирования белок-белковых взаимодействий с применением аффинного выделения белковых комплексов и их последующим количественным масс-спектрометрическим анализом. Для реализации дифференциального профилирования, то есть определения относительного содержания белков в исследованиях индуцированной дифференцировки часто используют платформу, комбинирующую 2D-гель электрофорез с идентификацией белков масс-спектрометрическим методом, чаще всего с использованием MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-of-Flight) – матричной ассоциированной лазерной десорбции/ионизации. Относительный количественный анализ с помощью 2D-гель электрофореза позволяет зарегистрировать изменения содержания белков в образце. Большим достоинством данного подхода является возможность исследования посттрансляционных модификаций.

Крупные белки для анализа предварительно разрушают с помощью фермента трипсина с получением набора пептидов. Сравнения полученную картину молекулярных масс пептидов для исследуемого белка с пептидными картами белков из баз данных, можно установить, какой именно белок исследовался. Этот подход получил название «пептидной дакти-

лоскопии». Вместо фрагментации трипсином перед установкой образцов в масс-спектрометр фрагментацию белков на фрагменты можно осуществлять в самом масс-спектрометре, например, при помощи столкновения с молекулами инертных газов. При этом каждый пептид характеризуется массой иона-предшественника и набором масс ионов-фрагментов.



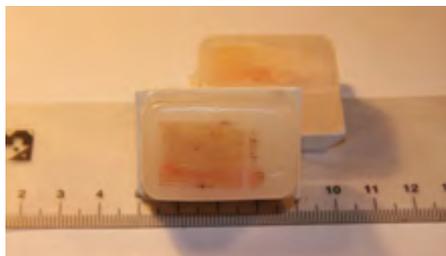
Принцип MALDI-TOF масс-спектрометра

Массы фрагментов можно измерить и по ним восстановить информацию об исходном белке, так как молекулярные массы фрагментов можно найти, исходя из последовательности пептида. Такой подход получил название тандемной масс-спектрометрии. Как и при пептидной дактилоскопии, в тандемной масс-спектрометрии имеет место вероятностная оценка того, что пептидная карта исследуемого белка соответствует одной из теоретических.

Масс-спектрометрические методы рутинно применяются для анализа низкомолекулярных биологических молекул. К настоящему моменту получено более 120 000 масс-спектров для нескольких тысяч органических и неорганических соединений, включая метаболиты, аминокислоты, сахара, липиды, лекарственные средства и т.п. Поэтому метод масс-спектрометрии можно использовать для получения метаболомных профилей.

Метод тканевых матриц

Для скрининга молекулярных маркеров оказался эффективным метод тканевых матриц, основанный на применении методов иммуоцитохимии и конфокальной лазерной иммуофлуоресцентной сканирующей микроскопии. Метод тканевых матриц представляет собой прицельный перенос фрагментов ткани из обычного парафинового блока (донорского блока) в «тканевую матрицу» (матричный блок), которая представляет собой множество смонтированных в один парафиновый блок тканевых фрагментов. Этот метод позволяет изучать экспрессию сигнальных молекул в клетках, проводить количественную оценку параметров экспрессии и осуществлять трехмерную реконструкцию микроскопических изображений.



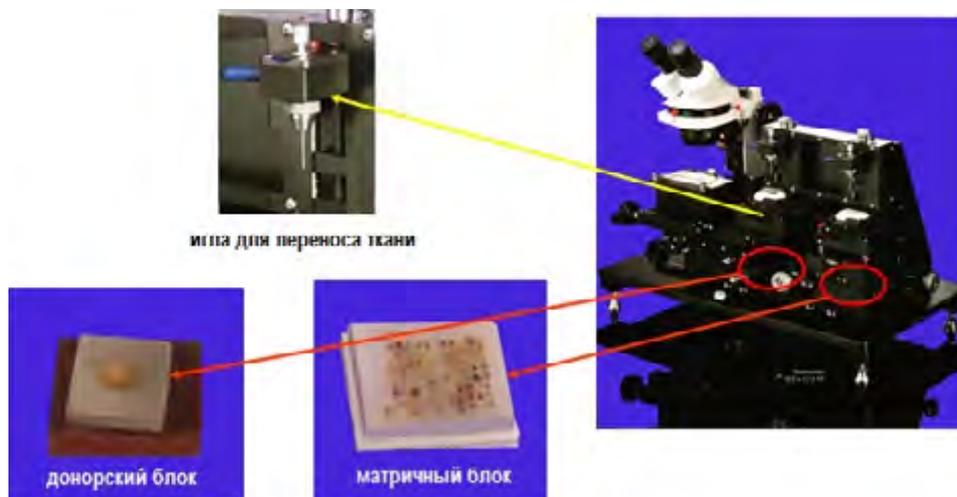
Вид тканевой матрицы

Тканевая матрица может быть изготовлена из нативных, свежемороженных, фиксированных в формалине, парафинизированных или депарафинизированных тканей.

Организационный этап подразумевает под собой разработку плана матрицы, отвечающего поставленным практическим задачам: определение вида и количества включа-

емых в матрицу образцов, формирование графической карты матрицы в системе координат X-Y. Как указывалось ранее, при использовании современной техники тканевая матрица может содержать до 1000 микрообразцов тканей. В данном случае ограничением количества образцов в матрице являются размеры стандартного предметного стекла. При составлении плана матрицы тканевые образцы могут быть сгруппированы в зависимости от органной принадлежности, вида опухоли и т.д. Предпочтительно располагать сгруппированный материал на поверхности матрицы асимметрично – это позволяет в последующем легко ориентировать полученные с матрицы микропрепараты в пространстве.

Подготовительный этап подразумевает под собой тщательный отбор донорских блоков. Каждый донорский блок должен сопровождаться срезом-микропрепаратом, окрашенным гематоксилином-эозином. Повторный анализ микропрепаратов позволяет подтвердить наличие требуемой ткани в блоке, сориентировать донорский блок в пространстве, выделить «зоны интереса» для пункционного забора материала.



Метод тканевых матриц (Tissue microarray)

Парафиновый блок самой тканевой матрицы по размерам обычно больше стандартных парафиновых блоков.

Создание ТМА обычно происходит в четыре этапа:

1. В установленном по карте матрицы месте реципиентного парафинового блока перфоратором-экстрактором вырезается лунка; удаленный при этом парафиновый цилиндр выбрасывается за ненадобностью.

2. В установленной заранее «зоне интереса», соответствующего карте донорского блока, перфоратором-экстрактором вырезается тканевой цилиндр.

3. Полученный тканевой цилиндр помещается в подготовленную лунку реципиентного парафинового блока; первые три этапа повторяются требуемое количество раз.

4. Готовая тканевая матрица подвергается микротомии.

Высота тканевых цилиндров, получаемых из стандартных донорских парафиновых блоков, обычно составляет 3-4 мм, что позволяет выполнить с тканевой матрицы не менее 200 полноценных срезов толщиной 4-8 мкм.

С момента появления первых тканевых матриц применение этого метода постоянно расширяется в силу ряда преимуществ. Тканевые матрицы значительно превосходят традиционные методы исследования, поскольку дают возможность быстро идентифицировать и охарактеризовать искомые объекты или молекулы-мишени в сотнях или даже тысячах образцов тканей.

Компактное расположение образцов тканей в матрице значительно упрощает их окраску с помощью рутинных методик и со специфическими для различных молекул антителами. Расположение на одном микропрепарате множества типов опухолей, а также нормальных тканей дает возможность проводить анализ и сравнение одного и того же искомого показателя в различных тканях при абсолютно равных условиях. Одним из важнейших преимуществ матриц является абсолютно идентичные условия окраски всех исследуемых образцов, а также положительных и отрицательных контролей. Это позволяет исключить относительные погрешности, возникающие при окрашивании разных микропрепаратов.

Матричные срезы могут быть окрашены широким спектром диагностикумов и оценены при помощи различных методов. В зависимости от вида материала и методики создания матрицы они могут быть использованы для окраски гематоксилин-эозином и с использованием других стандартных методов (иммуногистохимии, гибридизации *in situ*, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), ПЦР *in situ*, анализа экспрессии РНК и ДНК, оценки апоптоза).

Применение тканевых матриц в клинической морфологии существенно расширяет возможности диагностики различных видов патологии и позволяет перейти к достоверному прогнозированию возникающих изменений и выявлению молекулярных механизмов, определяющих развитие заболевания.

Секвенирование последовательности белка

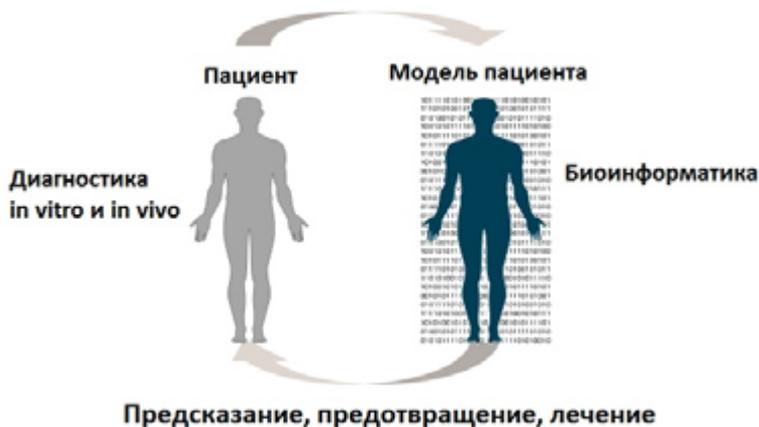
В 1953 году Фредерик Сенгер определил аминокислотную последовательность гормона инсулина. Для мечения и идентификации N-концевого остатка Сенгер предложил использовать 1-фтор-2,4-динитробензол. После связывания с этим реагентом N-концевого остатка белка полипептидную цепь гидролизуют соляной кислотой до отдельных аминокислот и выявляют меченый остаток. Если белок состоит из нескольких полипептидных цепей, то пометятся оба N-концевых остатка, то есть будет установлено число отдельных полипептидных цепей в белке. Для секвенирования всей белковой последовательности чаще применяют метод секвенирования по Эдману.

В 1950-х годах шведский химик Пер Эдман изобрёл метод определения аминокислотной последовательности белков (секвенирование). Первый этап секвенирования по Эдману – обработка исследуемого пептида изотиоцианатом фенила, который взаимодействует с аминогруппой, давая фенилтиокарбомойльный радикал. При умеренном закислении раствора он отщепляется, захватывая вместе с собой N-концевую аминокислоту. В результате в раствор выходит тиазолинон с радикалом, специфичным для данной аминокислоты. Это производное анализируют хроматографически, определяя, какая аминокислота была на N-конце, затем цикл повторяется. Если исследуемый белок закреплён на твёрдой подложке, то после каждой обработки изотиоцианатом фенила его можно промыть, удаляя тиазолинон с N-концевой кислотой, а затем начинать новый цикл. Метод Эдмана позволяет с высокой точностью определять последовательность длиной до 30 аминокислотных остатков. Высокая чувствительность метода также позволяет секвенировать менее 0,1 нмоль пептида с 99% точностью. Длина полипептидной цепи, которую можно секвенировать методом Эдмана, зависит от эффективности отдельных стадий, которая, в свою очередь, определяется аминокислотным составом полипептида.

В 1960-х был создан автоматический секвенатор, основанный на методе Эдмана. Первичную структуру инсулина, на определение которой у Сенгера ушло более 10 лет, в настоящее время можно получить за пару дней прямым секвенированием на белковом секвенаторе. Метод Эдмана изредка используют при исследовании организмов, геномные последовательности которых неизвестны. Традиционное секвенирование белков также применяют в тех случаях, когда многие их особенности (например, посттрансляционные модификации) нельзя узнать только лишь из последовательности гена.

БИОИНФОРМАТИКА

Результатом применения «-омиксных» технологий является большой массив числовых данных, требующий, как правило, автоматизированного компьютерного анализа.



Значение информационных технологий в медицине будущего

Термин «биоинформатика» ввела в 1970 году Полина Хогеввер, определив ее как изучение информационных процессов в биотических системах. В этом определении прослеживается связь биоинформатики с биофизикой. С наступлением геномной эры потребовалось техническое обслуживание баз данных для хранения биологической информации, поэтому термин «биоинформатика» получил новое значение. Создание таких баз данных поставило перед учеными задачи не только хранения, но и создания комплексного интерфейса, позволяющего исследователям запрашивать имеющиеся данные и добавлять новые. Сегодня биоинформатика стала важной частью многих областей биологии, в ней используются различные методы прикладной математики, статистики и информатики. В области генетики и геномики биоинформатика помогает в упорядочивании и аннотировании геномов и мутаций. Она играет роль в анализе гена, экспрессии белка и регуляции. Инструменты биоинформатики помогают в сравнении генетических и геномных данных и, в целом, в понимании эволюционных аспектов молекулярной биологии. В структурной биологии она помогает в симуляции и моделировании ДНК, РНК и белковых структур, а также молекулярных взаимодействий. В общем виде она помогает анализировать и каталогизировать биологические пути и сети, которые являются важной частью системной биологии и персонализированной медицины.

В настоящее время создаются разнообразные информационные ресурсы по нуклеотидным последовательностям ДНК и аминокислотным последовательностям белков. Крупнейшие из них: GenBank (<http://www.ncbi>).

nlm.nih.gov/Genbank/) – открытая бесплатная база данных Национального центра биотехнологической информации (США) содержит информацию о расшифрованных последовательностях ДНК и РНК; DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) – японская база данных ДНК; EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) – Европейская база, созданная на базе Европейской молекулярно-биологической лаборатории (EMBL), обеспечивает доступ к информации о ДНК, РНК, белков. Эти базы сегодня объединены в INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) – международную систему баз данных ДНК.

UniProt (<http://www.uniprot.org/>) – открытая бесплатная база данных белков создана на основе трех крупнейших Web-ресурсов: Swiss-Prot, TrEMBL и PIR – PSD. Swiss-Prot – швейцарская база данных белков, включающая информацию о посттрансляционных модификациях белков и описание функций белков.

TrEMBL – компьютерное приложение к Swiss-Prot, позволяющее автоматизированно устанавливать аминокислотные последовательности в результате выявления нуклеотидных последовательностей. Появление данного приложения вызвано активизацией работ по секвенированию ДНК.

PIR-PSD – база данных белков США, содержащая информацию по структуре и функциям белков.

Учитывая высокий клинический потенциал SNP различных генов и в целях выявления полезных прогностических и диагностических свойств SNP, учеными создаются различные информационные ресурсы SNP. Национальным центром биотехнологической информации США сформирована база данных SNP различных организмов, в том числе человека (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi).

В последнее время появилось много специализированных информационных ресурсов по метаболическим путям, протеомике, мутациям, на основе которых создаются специальные программы по анализу данных конкретного пациента, что позволяет с большой точностью отслеживать любые функциональные изменения внутри клетки. На основании полученных результатов можно разрабатывать индивидуальную стратегию лечения, которая будет наиболее эффективной в случае конкретной патологии. Лекарственные препараты будут направлены на конкретные мишени, установленные на основании определения биомаркеров. Поиск лекарств, наиболее эффективно влияющих на молекулярные мишени заболевания с минимальными побочными эффектами, также можно осуществлять с помощью математических программ. Разработка информационных ресурсов с подробной информацией о биомаркерах патологических состояний позволит корректировать лечение и обеспечивать профилактику заболеваний для каждого конкретного пациента.

Биоинформационный сайт SNPedia (<https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>) предоставляет информацию о предрасположенности к заболеваниям по нескольким тысячам SNP. Создаются базы данных по взаимосвязи мутаций в микроРНК и заболеваний (<http://www.mir2disease.org/>).

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

После того, как был прочитан геном человека, выяснилось, что только около 25000 генов определяют все процессы, жизнедеятельности в клетках человека. Понятно, что многие гены могут экспрессировать более, чем один белок. Регуляторные белки, РНК, некодирующие участки ДНК так же, как структурные и химические модификации ДНК, в настоящее время тщательно изучаются, однако до сих пор неизвестно, каким образом такое небольшое количество генов хранит в себе всю информацию о структурных и функциональных особенностях человеческого организма, и обеспечивает бесконечно большое разнообразие людей, которые населяют нашу планету. Эта проблема смыкается, с одной стороны, с вопросом о биологическом разнообразии организмов, а, с другой стороны, с исследованием индивидуальных особенностей каждого человека. Кроме того, неясно, в какой степени геном определяет индивидуальность организма и в какой степени воздействие окружающих факторов модифицирует проявления генотипа.

Сорок лет назад врачи обнаружили, что при введении анестезирующего препарата сукцинилхолина некоторые больные пробуждаются легко, без каких либо последствий для организма, а другие после пробуждения не могут дышать и остаются временно парализованными. При исследовании таких больных было обнаружено, что они обладают генетически обусловленной замедленностью метаболизма этого препарата. Позже метаболизм сукцинилхолина в организме человека был детально изучен при различных генетических вариантах. Было обнаружено, что примерно один из 3500 человек имеет две копии генов, приводящих его в группу риска. Этот случай впервые продемонстрировал наличие прямых связей между генетическими вариациями и индивидуальной реакцией пациента на лекарственные препараты. С тех пор накоплен большой объем информации, связанной с генетически обусловленными особенностями метаболизма отдельных химических соединений у разных людей, что помогает объяснить, почему один и тот же препарат эффективен для одного больного, но не оказывает никакого влияния на другого и токсичен для третьего. Аналогичные генетические варианты играют ключевую роль в ходе развития отдельной болезни как нозологической формы, имеющей типичные симптомы и метаболические нарушения у различных больных. Например, показано, что повышенный риск развития болезни Альцгеймера и рака молочной железы связан с генетическими особенностями людей, передающимися по наследству. Генетическими особенностями объясняется также развитие рака легкого у одних курильщиков и его отсутствие у других.

Термин «персонализированная медицина» появился относительно недавно в связи с концепцией в клинической медицине, получивший название «пациент-ориентированная диагностика и лечение». Этот подход был предложен Leo Galland. Он включает в себя системный анализ большого числа факторов, касающихся каждого отдельного больного, в том числе:

- симптомы и клинические признаки;
- результаты исследований наследственной патологии;
- био-психо-социальные факторы, в т.ч. поведенческие особенности пациента;
- результаты исследований тканевой патологии;
- данные, полученные стандартными методами дифференциальной диагностики болезней и отражающие состояние физиологических жидкостей и метаболических процессов в организме.

Любой план лечения рассматривает в этом случае больного человека как неповторимую индивидуальность, а не как воспроизводимый и повторяемый набор симптомов. Какую роль играет в данном случае генетический код человека и как результаты исследований индивидуальных особенностей генома позволяют решить проблемы персонализированной медицины? Для персонализированной медицины важными остаются три классических аспекта, которые также персонифицируются:

- персональная профилактика, включающая в себя поиск генетически обусловленной предрасположенности к развитию тех или иных болезней, так называемых «слабых мест» организма;
- персональная диагностика возникшего патологического состояния;
- персональное (индивидуальное) лечение.

Для персонализированной медицины существенными являются следующие вопросы:

Какие медиаторы участвуют в патологическом процессе у данного больного?

Какие триггерные механизмы участвуют в активации этих медиаторов?

Необходимо распознать все медиаторы, участвующие в развитии заболевания у данного больного, в том числе те, которые обычно не включаются в исследуемые классы, а также такие факторы, как, например, социальная поддержка и общественное признание. Характеристика пациента играет важную роль в разработке подходов к лечению. Медиатор непосредственно определяет появление симптомов и клинических признаков заболевания. Медиаторами могут быть как биологические агенты, так и эмоциональные состояния. Биологические медиаторы включают в себя простаноиды, цитокины, нейротрансмиттеры, гормоны, например, мелатонин, ионы и кислородные радикалы и продукты перекисного окисления. К эмоциональным состояниям медиаторного типа можно отнести страх, гнев, верования, условности и социальные ограничения. Поиск и распознавание всех первичных и вторичных медиаторов необходимы для последующей разра-

ботки наиболее эффективной индивидуальной стратегии лечения. Многие медиаторы участвуют в сохранении и поддержании гомеостаза в сложных биологических системах. Все важные регуляторные функции основываются на действии множества медиаторов, составляющих более чем одну цепь. Тем не менее, общее количество важных медиаторных каскадов или петель относительно невелико по сравнению с общим количеством болезней, число которых доходит до нескольких тысяч.

Генетические исследования позволяют определить степень риска ряда социально значимых заболеваний и обозначить соответствующую стратегию профилактики и лечения. Однако в реальности до настоящего времени пока лишь установлено наличие корреляционной связи между наличием или дефектом в том или ином гене и особенностями протекания метаболических процессов в организме, но не доказана ответственность генов за эти особенности. Даже если эта ответственность будет доказана, то доведение этой информации до стадии реального применения генетических исследований в терапевтической практике является грандиозной задачей, на решение которой уйдут многие годы.

Триггер – это внешнее или внутреннее свойство организма, способное непосредственно активизировать медиаторы или как-то иначе способствовать началу их действия. Такие факторы окружающей среды как плохое освещение, нарушение гигиены сна, эмоциональное состояние, стресс и изменение условий жизни при перемене места жительства, выходе на пенсию и т.п. могут стать экзогенными триггерами. В то же время степень реакции на эти факторы так же, как на действие никотина, неправильную диету и т.п. определяется совокупностью генов. На генетическом уровне для развития ряда заболеваний, таких как различные виды рака, инфаркт миокарда, аутоиммунные заболевания, депрессивные состояния и т.д. нужна активация набора генов, которые вступают во взаимодействие с экзогенными и эндогенными факторами. Эта генетическая обусловленность и специфическая совокупность медиаторов и триггерных механизмов гораздо тоньше и сложнее, чем предполагалась ранее. Конечно, в ряде случаев существует прямая связь между дефектом гена и заболеванием, например, при гемофилии или муковисцидозе. В этих случаях возможно статистически достоверное, строго экспериментально подтвержденное использование полученной информации в клинике. Мультигенное взаимодействие не позволяет использовать исследование генов в широкой практике для диагностики, прогнозирования течения болезни и выбора стратегии лечения. Так, в 2004 году группа исследователей обнаружила 124 гена, связанных с развитием устойчивости к четырем препаратам, применяемым при лечении лейкемии.

Идентификация мультигенных систем является лишь началом большой работы. Одной из самых сложных задач является повторяемость экспериментов, особенно в случае заболеваний, наследуемость которых не явля-

ется несомненной (например, астма) либо тех, которые поражают относительно небольшой контингент больных (например, в случае некоторых заболеваний у детей). Кроме того, генетические исследования могут быть чрезмерно дорогими и недоступными для широкого применения.

Тем не менее, генетический аспект некоторых заболеваний – онкологических, кардиологических, астмы и т.д. активно изучается. Успехи генетических исследований при психических заболеваниях значительно скромнее, однако при острых случаях шизофрении или при тяжелой депрессии можно было бы получить огромный экономический эффект и высокую эффективность лечения, если бы удалось найти генетическую основу специфического действия определенных доз лекарственных препаратов или индивидуальной устойчивости к их действию. Однако в психиатрии имеет место не только мультигенность, но и затруднения, связанные с количественной оценкой лекарственного действия препарата.

Поскольку секвенирование ДНК становится все более доступным, а технологии, применяемые для исследований, все более эффективными, то перспектива определения некоего «идеального» генотипа, обеспечивающего развитие фенотипически здорового человека, кажется вполне доступной. «Генетические инструменты», такие как карта гаплотипа, используемая для обнаружения генетических отклонений, позволят облегчить поиск генетических нарушений, ответственных за те или иные болезни.

Следующим шагом может быть разработка ДНК-тестов для проведения клинических исследований и постановки диагноза. Внедрение таких тестов в практику, видимо, потребует долгого времени. В случаях острых состояний – приступе астмы, инфаркте миокарда или острой форме онкологического заболевания генетические исследования могут быть ценными только в случае, если они будут давать точные результаты за короткий промежуток времени.

Следует также учитывать, что, независимо от успехов фундаментальных и прикладных отраслей медицинской науки, в конечном итоге, персонализированная медицина может развиваться только в том случае, если это будет выгодно фармацевтическим компаниям. Многие компании обеспокоены тем, что в результате генетических исследований сократится рынок потребления фармацевтических препаратов и снизятся их доходы, поэтому они не инвестируют исследования в этой области.

Тем не менее, следует выделить несколько основных направлений исследований, которые могут быть важны для решения вопроса о том, насколько индивидуальные особенности человека важны для лечения с точки зрения персонализированной медицины:

- определение генетического своеобразия человека как вида, отличающего его от прочих представителей животного мира и составление его генетической карты (только 1,2% генома отличает человека от шимпанзе). Какие именно гены делают человека человеком, а болезнь – человеческой,

т.е. связанной со специфическими социальными, интеллектуальными и проч. факторами? Сложность этого вопроса обусловлена, в частности, тем, что «knockout» – исследования не могут быть проведены на человеке и высших приматах по этическим соображениям, поэтому для получения результатов требуется проведение огромного количества наблюдений с дальнейшей статистической обработкой. Побочным результатом такой работы является создание адекватных моделей для исследования тех или иных патологических процессов и их лечения;

- составление генетической карты «идеального здоровья» для представителей различных рас (наций) и их сравнительный анализ при помощи современных методов статистического компьютерного анализа. Сложность решения этой задачи связана с секретностью информации, касающейся безопасности нации. Публикация данных, касающаяся генетической карты большинства членов общества, ставит по угрозу здоровье общества в целом;

- составление индивидуальных генетических карт с определением генетической предрасположенности индивидуума к социально значимым заболеваниям (иммунодефицитным состояниям, онкологическим заболеваниям, инфаркту миокарда, инсульту, эндокринным нарушениям, психическим заболеваниям и т.д.). Отдельным аспектом проблемы является развитие единых компьютерных сетей, в которые были бы внесены результаты генетических исследований отдельных людей;

- формирование стандартного протокола диагностики и лечения каждого пациента с учетом всех требований PCD-подхода, в том числе поиск всех медиаторов и триггеров развития каждого конкретного заболевания. Индивидуальный подход не означает отказ от стандартов лечения. Например, при инфекционном процессе индивидуальная чувствительность к антибиотикам, наряду с генетически обусловленными особенностями врожденного и адаптивного иммунного ответа, не исключают применения собственно препарата, уничтожающего возбудителя заболевания.

- внедрение в мышление практических врачей разного уровня идеи о необходимости исследований генетического статуса как отдельных пациентов, так и различного контингента больных.

Клиницисты должны учиться распознавать, понимать и учитывать влияние как генотипа, так и всех психо-социальных факторов на процесс развития болезненных процессов. Этот так называемый сдвиг парадигмы в мышлении многих практических врачей уже происходит, однако многие из них еще не готовы к этому.

МЕДИЦИНА 4П

Сам термин «персонализированная медицина» впервые появился в 1998 году в качестве названия монографии швейцарского врача Кевела Джайн, изданной в 1998 г. С этого периода начинается активное развитие персонализированной медицины как новой концепции современной медицины.

Персонализированная медицина включает четыре составляющих – предиктивно – превентивную, персонализированную и партисипативную медицину, поэтому она получила название – медицина 4П.

Предиктивная (предсказательная) медицина выявляет предрасположенность к развитию заболевания.

Превентивная (профилактическая) медицина – предотвращает или минимизирует риск развития болезни.

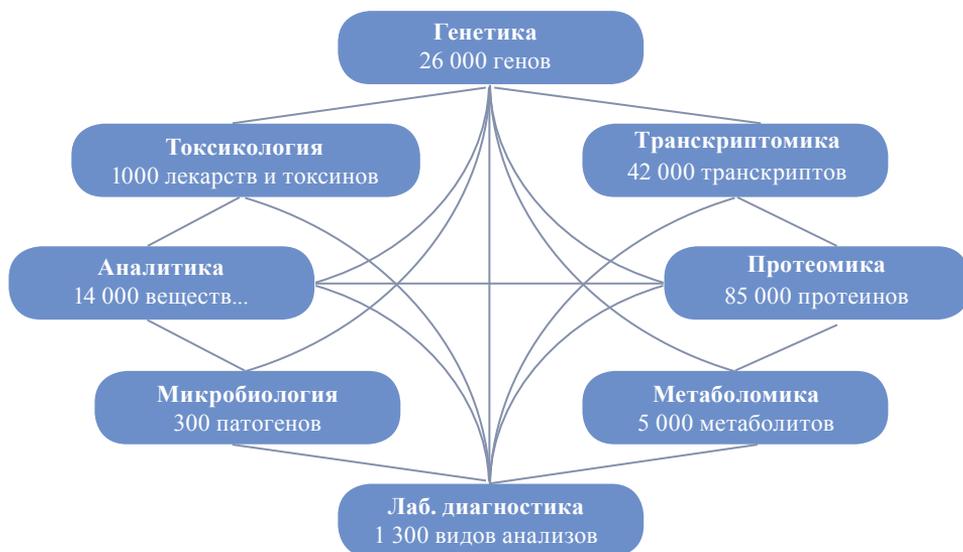
Персонализированная медицина – персонализированная фармакотерапия уже развившегося патологического состояния на основе фармакогенетики.

Партисипативная медицина – активное участие человека в профилактике возможных заболеваний и их лечении.

Основные задачи персонализированной медицины связаны с обнаружением рисков развития патологии конкретного человека или с выявлением патологии на ее доклиническом этапе, оптимальной коррекцией выявленных нарушений с помощью лекарственных средств или за счет изменения образа жизни. В случае, если патологическое состояние уже развилось, необходимо подбирать фармакотерапию на основе индивидуальных генетических особенностей пациента путем определения биомаркеров. Аналогичный подход необходимо применять для мониторинга динамики заболевания и его прогноза.

Решение указанных задач возможно благодаря индивидуальному молекулярному портрету конкретного заболевания, сформированному в патологически измененных клетках и тканях и зависящему от координации разнообразных сигнальных путей. В результате образуется набор персональных специфических биомаркеров, которые указывают на наличие или отсутствие патологического состояния, т.е. являются индикаторами болезни, а также помогают оценивать эффективность терапии и прогноз заболевания.

Из этого следует, что фундаментальную основу для развития стратегии медицины 4П обеспечивают биомаркеры, специфичные для каждого конкретного пациента и каждого конкретного заболевания, а молекулярной диагностике отводится главная роль в обеспечении эффективности медицины 4П.



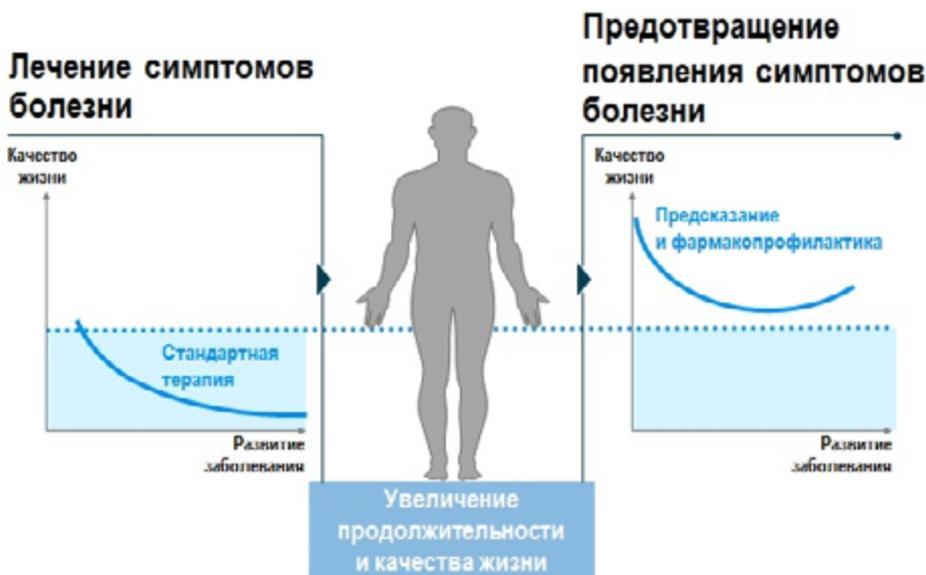
Биомаркеры – основа персонализированной медицины

Молекулярные биомаркеры, традиционно используемые в диагностике, включают мутантные гены, РНК, белки, липиды, углеводы, метаболиты. Необходимо, чтобы уровни экспрессии молекулярных биомаркеров положительно или отрицательно коррелировали с патологическими изменениями клеток или клинической картиной. В этом случае молекулярные биомаркеры будут являться индикаторами заболевания и мишенью индивидуальной терапии.

Выявление указанных биологических маркеров перспективно при использовании современных технологий, таких как геномика, транскриптомика, эпигеномика, протеомика, метаболомика. Данные технологии позволяют работать с большим массивом данных, что позволяет обнаружить уникальные патоморфологические изменения, характерные для заболевания конкретного человека. В этом случае возможно подобрать персонализированное лечение, которое будет более эффективным.

Предиктивно-превентивная медицина

В медицине на протяжении ее исторического развития основное внимание уделяли уже заболевшему человеку, делая акцент на учении о болезни (нозологии), и поэтому информация о здоровом человеке и т.н. донозологических состояниях, предшествующих болезни, оставались в тени. Кардинальный перелом произошел в конце XX – начале XXI века, когда произошло активное внедрение в клиническую практику достижений ге-



Основные принципы персонализированной медицины

номики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, позволяющих анализировать функциональное состояние клетки до появления признаков заболевания.

В связи с этим развитие предиктивно-превентивной медицины является первым шагом в развитии и становлении медицины будущего. Основной задачей предиктивно-превентивной медицины является разработка и осуществление широких санитарно-оздоровительных и лечебно-профилактических мер по охране здоровья населения и среды его обитания, а также развитие у населения мотивации на здоровый образ жизни с целью предупреждения заболеваемости, инвалидизации и увеличения продолжительности жизни. Для этого необходимо выявлять визуально не определяемые доклинические изменения молекулярного уровня (молекулярные маркеры), свидетельствующие о начальных этапах развития определенной патологии в организме обследуемого. Обычно, данные маркеры еще не выявляются с помощью УЗИ, рентгена, МРТ и т.п. Далее должна быть назначена адресная донозологическая биомедицинская коррекция (преимущественно безмедикаментозная), направленная на остановку развития определенного патологического процесса, начальные доклинические признаки которого выявлены у конкретного пациента.

Одним из путей реализации мероприятий превентивно-предиктивной медицины является развитие неонатального скрининга.

Среди разнообразных биологических маркеров в рамках предиктивно-превентивной медицины важное место принадлежит генетическим марке-

рам. Во второй половине XX века научные интересы в области генетической патологии были сосредоточены на моногенных болезнях, вызванных генотипом с высоким риском развития заболевания, таких как фенилкетонурия, болезнь Хантингтона, мышечная дистрофия Дюшенна, кистозный фиброз, а также на редких хромосомных аномалиях. В 1980-х годах появилась специальность «клиническая генетика», стало возможным генетическое консультирование пациентов и их семей. В настоящее время генетическая диагностика хромосомных и моногенных заболеваний успешно реализована в сфере здравоохранения.

В настоящее время неонатальный скрининг в Российской Федерации проходит по пяти основным нозологиям: адреногенитальный синдром, галактоземия, муковисцидоз, фенилкетонурия, врождённый гипотиреоз, а с 2018 года в г. Москве скрининг проводят на 11 нозологиям. В Свердловской области уже начался эксперимент по обследованию новорожденных на 40 нозологий, для 29 из которых сегодня существует эффективное лечение.

Активно развивается предимплантационная генетическая диагностика (при числе клеток около 10) эмбриона, развившегося в результате искусственного оплодотворения. Определяется наличие маркеров наследственных заболеваний, после чего решается вопрос о целесообразности имплантации эмбриона в матку.

В то же время по данным Всемирной организации здравоохранения, основной причиной смерти в мире и в России, в том числе, являются хронические неинфекционные заболевания, такие как сердечно-сосудистые, онкологические, заболевания органов дыхания и диабет. Сложившаяся ситуация требует изменения приоритетов при планировании стратегии укрепления здоровья населения, а именно смещение акцента от клинического подхода в сторону профилактических программ. В связи с этим развитие ДНК – диагностики мультифакториальных заболеваний (МФЗ) позволит предотвратить развитие заболеваний и увеличить продолжительность жизни.

В основе любого МФЗ лежат генетические и негенетические факторы развития. В ряде случаев заболевание может быть обусловлено кумулятивным эффектом нескольких факторов: генетических факторов (один или несколько генов), экологического воздействия (химические факторы окружающей среды), вредных привычек (курение, алкоголь, жирная и острая пища) и др. Для точной оценки рисков заболеваний потребуются знания о многочисленных генетических полиморфизмах, которые следует учитывать в сочетании с негенетическими факторами. На сегодняшний день такая информация в большинстве случаев отсутствует. В то же время обнаружение этих недостающих взаимодействий может быть полезным для более точного предсказания рисков.

Для большинства распространенных МФЗ наследственные факторы не являются строго определяющими для их развития, поэтому говорят о наследственной предрасположенности к заболеванию. Однако, почти во всех

категориях этих заболеваний имеется одна или несколько подгрупп, составляющих не более 5–10% всех случаев заболевания, связанных с действием одиночных основных генов, которые подчиняются менделевским законам наследования. К таким заболеваниям относятся рак молочной железы и яичников с аутосомно-доминантным типом наследования мутаций в генах BRCA1/2, синдром Линча при колоректальном раке, дилатационные кардиомиопатии, гиперхолестеринемия, гемохроматоз, эмфизема легких, сахарный диабет MODY – диабет взрослого типа у молодых (Maturity-onset diabetes of the young), сахарный диабет 2-го типа, болезнь Альцгеймера, тромбофилии и другие заболевания. Риск развития заболевания в этих случаях был выявлен с высокой степенью достоверности в многочисленных клинических исследованиях. Оценка клинической достоверности и значимости в этих случаях должна соответствовать тем же правилам, которые рекомендованы для других моногенных менделевских заболеваний. Тестирование для этих моногенных подтипов распространенных болезней внедряется в практику здравоохранения в некоторых странах Европы. Однако, для большинства стран и России, в том числе, к настоящему времени генетическое тестирование пациентов и семей, попадающих в категорию менделевских форм распространенных МФЗ, еще не вошло в рутинную медицинскую практику. Внедрение генетического тестирования распространенных МФЗ с менделевским типом наследования в практику общественного здравоохранения полностью укладывается в концепцию персонализированной медицины и приведет к снижению заболеваемости и смертности.

Основной доклинической диагностики должны стать базовые алгоритмы, которые существенно отличаются от клинического подхода. Что же должна делать доклиническая диагностика для решения вышеуказанных задач?

Во-первых, уметь своевременно определять генетическую предрасположенность к возникновению конкретной патологии.

Во-вторых, с высокой степенью достоверности определять количественный показатель риска возникновения патологии на ее доклиническом, бессимптомном этапе.

В-третьих, в ходе слежения за динамикой содержания биомаркеров и биопредикторов контролировать ответные реакции лиц из группы риска на фаракопревентивные мероприятия.

Рассмотрим алгоритмы превентивно-предиктивной медицины на примере двух заболеваний: рассеянный склероз (РС) и сахарный диабет (СД1).

На 1-ом этапе (этап предикции) врач должен определить группу риска. Это позволяет лечащему врачу работать с лицами из групп риска еще на доклинической стадии, в связи с чем совокупность данных геномики, протеомики и метаболомики оказывается важным методом оценки рисков для членов семей пациентов с диагнозами СД1 и РС.

На этом этапе необходимо, используя технологии генетического полиморфизма и секвенирования ДНК, а также информацию, полученную из трех основополагающих источников – генеалогического дерева, анамнеза *motu* и анамнеза *vitalis*, идентифицировать людей, предрасположенных к развитию данного заболевания, сформировав для 2-го этапа соответствующие группы риска.

На сегодняшний день достаточно хорошо определены почти все гены, мутации в которых увеличивают риск развития СД1 и РС. Не менее важным методом оценки рисков является определение аутоантител к белкам β -клеток (в случае СД1), олигодендроцитов, аксонов и миелина (в случае рассеянного склероза). Разработана универсальная модель ауто-иммунного заболевания, которая значительно облегчает поиск и определение биопредикторов хронизации, необходимых для формулирования прогноза и разработки протоколов фармакопревенции. Сочетанное гено- и фенотипирование лиц из групп риска на биопредикторы обеих категорий (геномики и протеомики одновременно) существенно повышает вероятность предикции (до 85–90%). Аналогичные алгоритмы можно разрабатывать для любых социально значимых заболеваний.

Таким образом, медицина будущего должна быть построена на новой парадигме лечения больных. Реализация профилактических программ и воздействие на управляемые факторы риска здоровью позволят рационально распределять ресурсы и средства для сохранения здоровья населения.

Персонализированное лечение: интеграция диагностики и лечения

Персонализированное лечение подразумевает отход от уравнительного подхода к лечению и уходу за больными людьми, а выбор индивидуального, основанного на патогенетических маркерах конкретного пациента лечения. Такой подход предполагает лучшее управление заболеванием пациента и достижение лучших результатов.

Традиционно медицина строилась вокруг врачей, специализирующихся на определенной системе органов: кардиологи, неврологи, нефрологи, гастроэнтерологи и т.д. Персонализированная медицина переворачивает этот подход с ног на голову. Она признает, что сложные заболевания следует рассматривать как единое целое.

При каждом конкретном заболевании формируется индивидуальный молекулярный портрет патологически измененных клеток и тканей, зависящий от взаимодействия или координации разнообразных сигнальных путей. В результате формируется набор специфических биомаркеров, которые одновременно являются индикаторами патологического процесса, указывающими на наличие или отсутствие болезни, и индикаторами

тактики лечения, учитывающей эффективность лечения и прогноз заболевания. В связи с этим эффективность медицины 4П выше в современной медицине.

В настоящее время принципы медицины 4П наиболее успешно применяются в онкологии, составляя примерно 50% всех исследований в этом направлении. 4% исследований проводятся в психиатрии, столько же в иммунологии. По 6% – в эндокринологии и в случае заболеваний опорно-двигательного аппарата. 7% приходится на сердечно-сосудистые заболевания и 23% – на прочие заболевания.



Вклад персонализированной медицины в терапию различных заболеваний

Персонализированная терапия в онкологии

За последние 30 лет произошли существенные успехи в понимании патогенетических механизмов развития онкологических заболеваний с точки зрения нарушения генной экспрессии. Это дает надежду на персонализированный подход к терапии каждого конкретного пациента, основанный на молекулярной информации омиксных технологий. В настоящее время уже накоплены знания в области взаимосвязи мутаций в определенных генах с патогенезом онкологического заболевания. Однако, несмотря на

многочисленные научные исследования в этой области, клиническая реализация полученных знаний ограничена из-за отсутствия валидации геномного анализа и клинической результативности.

С точки зрения персонализированной медицины в онкологии можно выделить несколько актуальных направлений: поиск маркеров риска возникновения опухолевых заболеваний в группе риска, диагностика наследственных форм опухолевых заболеваний, поиск маркеров первоначальных стадий опухолевого процесса, выявление маркеров, свидетельствующих о неблагоприятном прогнозе, поиск метастазов и маркеров, влияющих на фармакокинетику и фармакодинамику.

Например, аномалии гена *TP53* были обнаружены в более, чем 50% всех злокачественных опухолей человека. Выявление таких мутаций в анамнезе может прогнозировать увеличение риска развития онкологических заболеваний. Обнаружение мутаций в гене ДНК-метилтрансферазы *DNMT3a* также может служить критерием для медицины 4П. Данные мутации выявлены в 25% случаев острого миелоидного лейкоза. Мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53* ассоциированы с высокими рисками развития рака молочной железы.

Ярким примером диагностической значимости генетических маркеров служит выявление мутаций в гене *EGFR*. Продемонстрирована гиперэкспрессия *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого (40–70%). Применение препаратов – ингибиторов тирозинкиназной активности (гефитиниб, эрлотиниб) будет эффективно только в случае отсутствия мутаций в гене *EGFR*. Делеция в экзоне 19 гена *EGFR*, которая наблюдается у 10% больных, приводит к резистентности таких больных к терапии ингибиторами тирозинкиназной активности, что подтверждает необходимость молекулярно-генетического анализа мутаций для персонализированной терапии.

К семейству рецепторов эпидермального фактора роста EGFR также относится рецептор HER2, являющийся мембранным белком с тирозинкиназной активностью. Гиперэкспрессия этого белка выявлена в 25–30% случаев рака молочной железы и является следствием мутации в данном гене. Установлено, что гиперэкспрессия гена *HER2* играет важную роль в патогенезе рака молочной железы.

С целью блокирования пролиферативного сигнала перспективно применение лекарственного препарата трастузумаб (герцептин), представляющего собой моноклональные антитела. В многочисленных клинических исследованиях продемонстрирована эффективность этого лекарственного препарата. В настоящее время проходят клинические исследования по применению герцептина для лечения HER2-положительного рака желудка. Таким образом, мутации в гене *HER2* и гиперэкспрессия этого белка являются классическим биомаркером и терапевтической мишенью при этом заболевании.

Другим примером персонализированного подхода является исследование мутаций в протоонкогене *KRAS*, которые в 30–35% случаев вы-

являются при раке легкого, колоректальном раке и раке щитовидной железы. Белок KRAS является мультифункциональной сигнальной молекулой, участвующей в различных каскадах регуляции пролиферации и апоптоза клеток. Было обнаружено, что в случае мутаций в гене KRAS наблюдается резистентность опухолевых клеток при лечении ингибиторами тирозинкиназы.

Исследование мутаций в гене *KIT* при меланоме и в гене *Flt3* при острых нелимфобластных лейкозах также позволяет проводить персонализированное лечение этих онкологических заболеваний.

Благодаря признанию концепции персонализированной медицины, разрабатываются диагностические тесты, позволяющие оценивать индивидуальные метаболические особенности пациента при назначении эффективной и безопасной терапии. Большинство таких тестов основано на технологиях генетического анализа, однако активно развиваются технологии визуализации биомаркеров в режиме реального времени с использованием биосенсоров.

Наиболее результативными на сегодняшний момент времени можно считать диагностические тесты по выявлению биологических маркеров рака молочной железы. С середины 2000-х годов в США, Канаде, Японии, различных странах Европы были начаты клинические исследования по оценке значимости генетических маркеров при раке молочной железы. Исследования проводятся с использованием нескольких коммерческих генетических наборов: Oncotype DX, MammaPrint, IHC4, PAM50, Mammostrat. Изучаются различные клинические исходы – 5-летняя выживаемость, общая выживаемость, рецидив рака, патологический ответ на неоадьювантную терапию, экономическая эффективность и т. д. Экономическая эффективность оценивалась в ходе 10-летних исследований с использованием Марковской модели.

В многочисленных клинических исследованиях была продемонстрирована высокая клиническая и экономическая эффективность диагностического теста Oncotype DX в отношении 1–2-й стадий гормон-зависимого рака молочной железы. Генетический анализ Oncotype DX позволяет изучить экспрессию 21-го гена с помощью RT-PCR. Благодаря этому анализу можно охарактеризовать опухолевую ткань, в том числе ответ опухоли на лечение, результат лечения, вероятность рецидива и др. Данный тест включен в лечебные протоколы Национальной комплексной онкологической сети США (NCCN) и Американского общества медицинской онкологии (ASCO).

Также перспективным считается диагностический тест MammaPrint, предназначенный для оценки риска рецидива рака молочной железы или появления метастазов в течение 10 лет после удаления первичной опухоли. Данный тест позволяет принять решение относительно необходимости химиотерапии в качестве дополнительного лечения. MammaPrint разрешён

к использованию в США Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в феврале 2007 года. С помощью данного теста оценивается экспрессия 70 генов при раке молочной железы при помощи ДНК-микрочипа. Диагностические тесты Mammostrat, IHC4, PAM50, CAPRA-S, Decipher и другие в настоящее время проходят клинические исследования не только в отношении рака молочной железы, а также других онкологических заболеваний - колоректального рака (12-gene assay), рака простаты (CAPRA-S, Decipher) и немелкоклеточного рака легких (GC-14-ген). Клиническая и экономическая эффективность данных наборов была подтверждена. Однако, многие лекарственные средства демонстрируют значительные вариации в отношении эффективности и безопасности, обусловленные генетической гетерогенностью опухолей у пациентов разных национальностей.

С точки зрения медицины 4П важное значение в выявлении риска развития различных заболеваний имеет выявление полиморфных участков ДНК, таких SNP и CNV.

SNP составляют около 90% всей человеческой генетической изменчивости. В последние два десятилетия было обнаружено более 10 миллионов SNP. В то время как большинство SNP не оказывает влияние на физиологические процессы, некоторые из них вовлечены в развитие заболеваний или в метаболизм лекарственных средств, влияя тем самым на ответ пациентов на лекарства.

Например, лекарственный препарат иринотекан применяется в химиотерапии больных раком толстой кишки. Будет ли данный препарат эффективен для конкретного пациента, может предсказать один SNP в промоторной области гена, отвечающего за синтез фермента уридиндифосфатглюкуронидазы-1, участвующего в метаболизме иринотекана.

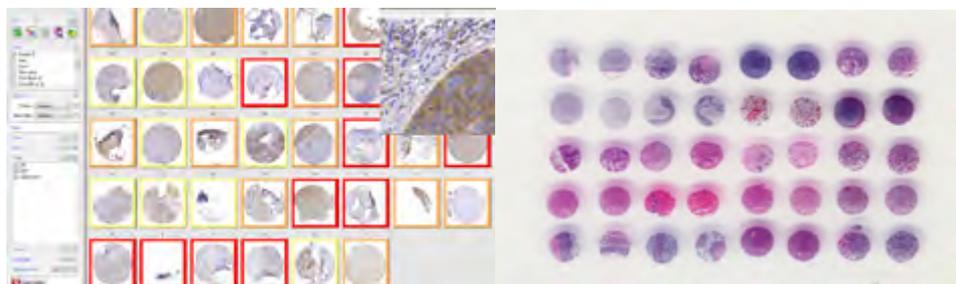
В случае полиморфизма гена количество фермента снижается и, соответственно, концентрация иринотекана в организме повышается. В этом случае применение иринотекана невозможно в силу высокой токсичности. Анализ данного гена является первым фармакогенетическим тестом, рекомендованным к применению при лечении солидных опухолей.

В настоящее время роль SNP в патогенезе онкологических заболеваний дискутируется. Тем не менее, с расширением исследований в этом направлении и с появлением методов, позволяющих одновременно выявлять большое количество одонитевых полиморфизмов, которые значительно чаще встречаются при онкологических заболеваниях, чем у здоровых лиц, удалось обнаружить одонитевые полиморфизмы, указывающие на высокую восприимчивость к раку легких, раку верхних дыхательных путей, колоректальному раку, раку молочной железы. В настоящее время считают, что SNP ассоциируются с повышенным риском развития онкологических заболеваний.

Метод тканевых матриц в персонализированной медицине

С помощью метода тканевых матриц проводится предимплантационная диагностика эмбриона, развившегося в результате искусственного оплодотворения. Период имплантации определяется экспрессией большого количества сигнальных молекул, таких как цитокины, протеазы, хемокины, ионы, питательные и транспортные белки, которые осуществляют регуляцию клеточных и межклеточных взаимодействий. Эти взаимодействия модулируют физиологические процессы в эндометрии и формируют «поведение» бластоцисты, сохранение беременности и адаптацию к ней организма матери.

Имплантационная готовность эндометрия оценивается путём определения ряда биомаркеров, после чего решается вопрос о целесообразности имплантации эмбриона в матку. В случае успешной имплантации наибольшую информативную значимость имеют маркеры LIF и TGF (трансформирующий фактор роста (англ. transforming growth factor), высокий уровень экспрессии которых свидетельствует о готовности эндометрия к имплантации бластоцисты.



Экспрессия сигнальных молекул в эндометрии

Для выявления успешности имплантации необходимо также определять методом иммуногистохимии в люминальном эпителиальном пространстве интегрин CD51 и CD61. Интегрины CD51 и CD61 первыми вступают в контакт с бластоцистой, являясь рецепторами прикрепления эмбриона. Снижение экспрессии этих интегринов приводит к нарушению имплантации.

Проведенные исследования позволили разработать панель маркеров, позволяющую оптимизировать диагностику причин бесплодия и прогнозировать успех имплантации. Для уточнения причин бесплодия применяется панель из 6-8 маркеров, позволяющих верифицировать тип и природу воспаления (в частности, диагностировать хронический эндометрит по

экспрессии CD138 – Syndecan-1, а также определять гормональный статус эндометрия).

Тканевые матрицы могут архивироваться и обрабатываться с помощью систем количественного анализа микроскопических изображений, что позволяет создать компьютерную базу данных и использовать ее как в научных, так и прикладных целях.

Тканевые матрицы также перспективны для верификации биомаркеров в диагностических и прогностических целях при различных онкологических заболеваниях. В качестве примера можно привести использование тканевых матриц для верификации экспрессии транскрипционных протеинов в диагностических и прогностических целях в случае рака яичников. Экспрессия протеина CXCL12 верифицируется в низкодифференцированных опухолях и ассоциируется с высоким метастатическим потенциалом опухоли. Иммунопозитивные клетки были обнаружены в 56 образцах из 407 и ретроспективный анализ историй болезней подтвердил прогностическую значимость данного маркера.

Примером верификации на одном препарате (карцинома яичника) служит экспрессия трех прогностических маркеров – рецепторов прогестерона (PR), фактора пролиферации Ki-67 и протеина Runx3 – фактора транскрипции-3 (от англ. runt-related transcription factor 3), по изменению экспрессии которых можно судить об эффективности лечения и прогнозе развития опухолевого процесса.

Благоприятный вариант – умеренная экспрессия Ki-67 (относительно низкая пролиферативная активность опухолевых клеток), высокие уровни экспрессии рецепторов прогестерона (чувствительность к синтетическим гестагенам) и выраженная экспрессия протеина Runx3 (сохранение профиля дифференцировки опухолевых клеток).

Высокая экспрессия протеина – фактора транскрипции Нох3 и слабая пролиферативная активность в образце рака желудка свидетельствуют о низком уровне инвазии и низком риске отдаленных метастазов.

Уровень экспрессии транскрипционных факторов Pax1 (англ. Paired box) в аденокарциноме почки является показателем прогноза послеоперационной выживаемости пациентов.

Эпигенетическая терапия: новый подход к персонализированному лечению

Обратимость аномальных эпигенетических модификаций делает опосредующие эту обратимость ферменты крайне привлекательными лекарственными мишенями при разработке таргетных эпигенетических препаратов. Ключевыми мишенями считаются ДНК-метилтрансфераза и гистондеацетилаза.

В 2000-х годах впервые два эпигенетических препарата, являющихся ингибиторами ДНК-метилирования и предназначенные для лечения больных с миелодиспластическим синдромом, были официально зарегистрированы и разрешены к клиническому применению FDA. Это 5-аза-цитидин (Вайдаза®) и родственный ему 5-аза-2'-дезоксцитидин, или децитабин (Дакоген®). Однако наряду с доказанной терапевтической активностью данные препараты продемонстрировали и значительную токсичность, которая являлась частой причиной возникающих при их использовании серьезных осложнений и отрицательных побочных эффектов. Поэтому основным требованием к эпигенетическим препаратам нового поколения, кроме их высокой эффективности и селективности, является максимально низкая токсичность и минимизация возникающих при их применении побочных эффектов. Еще одной важной задачей является получение новых эпигенетических препаратов в удобной для практического использования таблетированной форме, поскольку оба вышеуказанных лицензированных препарата являются инъекционными.

Есть все основания считать, что предлагаемые современные схемы комбинированной терапии с использованием эффективных и безопасных препаратов с эпигенетической активностью (в первую очередь ингибиторов ДНК-метилтрансфераз), восстанавливающих активность генов опухолевой защиты, окажутся новым мощным инструментом в лечении и профилактике распространенных гинекологических заболеваний, в том числе сопровождающихся бесплодием, и будут способствовать качественному улучшению репродуктивного здоровья нации.

Одно лекарство – одному пациенту

Современный блокбастерный подход к разработке лекарственных средств предполагает, что все пациенты должны аналогичным образом реагировать на данный препарат. Эффективность большинства современных препаратов проверена на большой популяции людей, и все пациенты с определенным заболеванием получают одинаковые лекарства, следуя стандартам лечения. Эффективность такой терапии составляет от 30 до 60%. Данные по клиническим испытаниям для нового лекарства просто показывают средний ответ исследования в группе. При этом существуют значительные индивидуальные отличия: некоторые пациенты не реагируют на лечение, в то время как другие демонстрируют хорошую реакцию. В ряде случаев подбор препарата происходит на основании проб и ошибок. Очевидно, что понятие «одно лекарство для всех пациентов с одним и тем же заболеванием» не выдерживает критики, и для медицины будущего необходим индивидуализированный подход. Персонализированная медицина позволит улучшить этот результат. На основе геномно-

Медицина будущего.

Персонализированная медицина: опыт прошлого, реалии завтрашнего дня

го, транскриптомного, протеомного и метаболомного анализа осуществляется стратификация больных и лечение должно быть адаптировано к каждому подтипу.



Принципы персонализированной терапии

«Главный постулат медицины будущего: «Лечить человека, а не болезнь!»»

Научные исследования в данном направлении активно развиваются в различных лабораториях мира, и

большинство крупнейших фармацевтических компаний уже начали внедрять принципы персонализированной медицины. Лидирующие позиции в сфере персонализированной медицины занимают компании Roche и Novartis. Это направление развивают и такие известные компании, как Pfizer, GlaxoSmithKline, AstraZeneca, Johnson & Johnson, Abbot, Eli Lilly & Co., Bristol-Myers Squibb и другие. Согласно оценкам медицинского исследовательского центра Университета Тафтс США (англ. Tufts University – <https://www.tufts.edu/>), от 12 до 50% текущих исследований фармкомпаний приходится на персонализированную медицину.

Таким образом, идеология персонализированной медицины оказывает существенное влияние на тактику терапевтического воздействия на ряд заболеваний, в первую очередь, таких, как онкологические заболевания, предлагая врачам выбор индивидуальных схем диагностики и терапии вопреки стандартным схемам лечения.

Партисипативная медицина

Партисипативная медицина – наименее развитое направление медицины 4П, которое возможно только при осознанном участии самого пациента в лечебном процессе. При этом предполагается определенная степень ответственности и самостоятельности больного, его участие в принятии решений, определении стратегии и тактики лечения. Для развития данного направления необходимо проведение просветительской работы среди работников здравоохранения и информирование населения о возможностях персонализированной медицины.

ЦИФРОВАЯ МЕДИЦИНА

«Цифровая медицина» и «цифровое здравоохранение» (от англ. – «digital healthcare») являются перспективными инновационными разработками современного здравоохранения и неотъемлемой частью медицины будущего. В основе этих терминов лежит использование в медицинской практике и практике здравоохранения сервисов и гаджетов для дистанционного взаимодействия с врачом, а также для удаленного мониторинга жизненных показателей пациента.

Применение цифровых технологий в медицине позволяет улучшить качество медицинской помощи за счет внедрения инновационных методов и новых методов лечения, повысить доступность медицинской помощи, что особенно важно для удаленных регионов нашей страны.

Внедрение телекоммуникационных технологий даёт возможность дистанционного обсуждения с коллегами оптимальных методов лечения пациентов, а для пациентов – получение дополнительных консультаций.

Использование электронных медицинских карт и историй болезни позволит обеспечить дистанционное консультирование пациентов врачами из различных медицинских учреждений.

С экономической точки зрения цифровые технологии будут способствовать повышению эффективности оказания медицинской помощи, контролю за оптимизацией затрат, упорядочиванию деятельности медицинских организаций, повышению эффективности управления в здравоохранении. Иными словами цифровые технологии позволят сделать лечение более своевременным, экономичным и персонализированным.

Цифровая медицина развивается по следующим направлениям: носимые устройства (гаджеты), биосенсоры, мобильные приложения, телемедицина, блокчейн-технологии и искусственный интеллект.

Следует отметить, что для внедрения цифровых технологий в медицинскую практику необходимо также, как и для других медицинских технологий, проведение клинических исследований для доказательства эффективности и безопасности использования этих технологий.

Носимые устройства и приложения по управлению здоровьем

Общие оздоровительные приложения и носимые устройства (гаджеты) сегодня составляют большинство медицинских цифровых технологий. На сегодняшний день доступно более 300 тыс. приложений для здорового образа жизни и более 350 носимых устройств, позволяющих управлять своим здоровьем. Для цифровых технологий необходимо использование подключенных мобильных устройств, в том числе мобильных телефонов, планшетов, компьютеров. Носимые устройства способствуют поддержа-

нию здорового образа жизни: правильного питания, оптимальной продолжительности и качества сна, занятия фитнесом и т.д. Они приобрели популярность во всем мире, позволяя изменить поведение пациента в сторону большей заботы о своем здоровье.

Мобильные оздоровительные приложения сосредоточены на «оздоровительном менеджменте», который отслеживает и вносит коррективы в занятия фитнесом, осуществляет контроль за образом жизни, сном, питанием, диетой, стрессом. Наибольшее количество приложений разработано Apple Store и Google. Около 73% мобильных оздоровительных приложений доступны на английском языке, тем не менее все чаще они выходят за пределы англоязычной аудитории. Наибольшим спросом пользуются мобильные приложения для самостоятельного занятия фитнесом и мобильные приложения для здорового питания.

Количество мобильных приложений для самостоятельных занятий фитнесом превышает 500 штук, причем из них имеют русско-язычный интерфейс. Количество пользователей приложений TOP 10 колеблется от 2,5 до 35 млн. человек. Прочие приложения имеют меньшее количество пользователей. Стоимость платных приложений от 5 до 99 долларов США в месяц. Есть и бесплатные приложения, однако наибольшим спросом пользуются платные приложения.

Большая часть приложений имеют идентичную направленность:

- Фитнес – тренировки
- Индивидуальные упражнения
- Установление конкретных целей
- Контроль показателей, отслеживание физической активности
- Интеграция со стандартными приложениями Google и Apple.

Существуют комбинированные приложения, совмещающие функции занятий фитнесом и рекомендации по здоровому питанию. Такие приложения лидируют по количеству пользователей.

В TOP 10 приложений по оценкам пользователей (количество пользователей больше 2 млн человек) входят «My Fitness Pal», «Runtastic app», «SworKit», «You are your own Gym», «StrongLifts 5x5», «Runkeeper», «Zombies, Run!», «Charity Miles», «My Fit», «Nike training Club». Наибольшее количество пользователей около 30 млн. человек у приложений «My Fitness Pal», «Runtastic app», «Runkeeper».

Есть также аналогичные российские приложения «Фитнес тренер онлайн» с количеством подписчиков более 50 тыс. человек. Бесплатное приложение включает 300 упражнений для тренировок, платное – индивидуальные тренировки с фитнес – тренером.

Большой популярностью также пользуются мобильные приложения здорового питания. Общее количество приложений здорового питания, доступных для пользователей телефонов Apple и Samsung, превышает 100 штук. В целом количество универсальных приложений здорового пита-

ния, за исключением специализированных диетических программ, в 5 раз меньше, чем количество Fitness – приложений. Большая часть приложений имеет только англоязычный интерфейс. Это объясняется более сложным пользовательским интерфейсом и необходимостью перевода большой базы данных продуктов питания на различные иностранные языки.

К лидерам рынка относятся приложения «Lifesium», «Sparkpeople», «My Plate calories», «Fat Secret Calories Counter», «Fooducate», «Lose it», «Lose weight without dieting», «My diet coach», «My net diary Calorie counter», «My Fitness Pal», «Yazio». Приложения с максимальным количеством пользователей существуют на рынке более 10 лет. Большая база продуктов – это результат постоянного обновления пользователями своих собственных меню, т.е. пользователи расширяют приложение на бесплатной основе. По стоимости приложения делятся на две категории: платные и бесплатные. Существуют также приложения с платными и бесплатными версиями. Стоимость подписки на платные приложения колеблется в интервале от 20 до 60 долларов США в год. Приложения с расширенным набором функций всегда платные.

Стандартный набор сервисов приложения:

- Счетчик калорий (сканирование по баркоду, ручной ввод)
- Дневник питания
- Рекомендованные стандартные диеты, формируемые на основании анкеты
- Планировщик питания
- Рецепты блюд (например, подборка блюд с различной калорийностью, уменьшение влечения к сладким блюдам)
- Установка индивидуальных целей по сокращению веса. Ежедневный контроль результатов.

Лучшие приложения включают в себя базу продуктов и блюд, превышающую несколько миллионов позиций.

Среди Российских приложений в этой области можно выделить «Дневник питания – мой рацион», «Минус 60 Pro», «НокоКалории».

Интересной особенностью цифровых носимых устройств и мобильных приложений стала игрофикация – использование технологий, помогающих выстроить отношения человека со здравоохранением в игровой форме. Ощущение победы, переход на новый уровень, участие в соревнованиях – эти аспекты игры позволяют чувствовать себя увереннее и мотивируют на новые достижения. Элементы игры могут превратить такие повседневные занятия, как поход к врачу, в деятельность, от которой можно получить отдачу в виде бонусов, баллов и других достижений. Игрофикация поможет привить людям навыки здорового образа жизни, сохранить позитивный настрой во время реабилитации, а также наладить взаимодействие с врачами. Например, в Philips использовали игровой подход при разработке своих продуктов по уходу за полостью рта. Зубная щетка Sonicare с мо-

бильным приложением позволяет научить детей чистить зубы дольше и эффективнее, а скучный процесс ухода за полостью рта превращается в занимательную игру. Спортивные браслеты позволяют совмещать тренировку и увлекательную игру. Фитнес-трекеры с функцией синхронизации способны быстро находить друзей-пользователей в социальных сетях, что помогает людям сравнивать свои успехи и мотивировать друг друга на новые достижения. Основными пользователями игровых технологий являются поколения, которые выросли в эпоху доступного интернета и видеоигр. Но игрофикация становится полезным инструментом и для людей старшего возраста. Это могут быть различные игры и тренировки, с помощью которых им легче поддерживать физическую активность и следить за своим здоровьем. Видеоигры показывают свою эффективность при реабилитации пациентов с патологией опорно-двигательного аппарата.

Примеры носимых устройств и приложений по управлению здоровьем (<http://top5-top10.ru/top-10-gadzhetov-dlya-zdorovya-organizma/>)

Кулон для правильной осанки «iPosture»



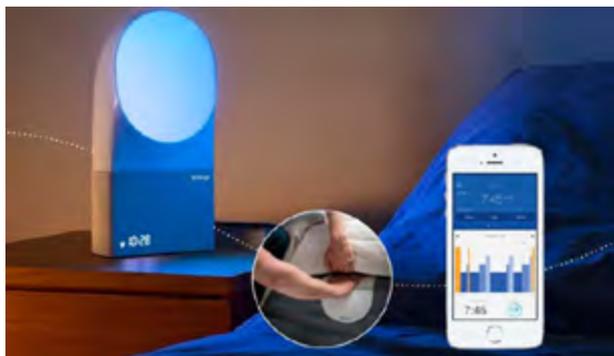
Кулон, диаметром 2,5 см, способен контролировать позу владельца. Кулон нужно повесить на шею или приклеить на кожу в области грудной клетки. Как только Ваша осанка изменилась, кулон начинает вибрировать, заставляя распрямиться. В кулон встроен датчик измерения отклонения верхней части туловища от вертикальной оси.

Умная вилка «Harifork»



Этот столовый прибор разработан французским инженером Жаком Лепэном и компанией Harilabs – производителем гаджетов для здоровья и активного образа жизни. Вилка контролирует быстроту потребления пищи: при повышенной скорости прибор начинает вибрировать в руках пользующегося. Запомнив пищевые привычки хозяина (количество еды, скорость и время потребления пищи), вилка анализирует данные и дает советы.

Контролер сна «Withings Aura»



Это умное устройство является, можно сказать, хранителем сна. Заботясь о качестве Вашего сна, он заботится о Вашем здоровье. Устройство контролирует фазы легкого и глубокого сна. После чего, проанализировав качество сна, дает полезные рекомендации на темы «как правильно заснуть» и «как правильно проснуться». Устройство не нужно во время сна надевать или приклеивать на себя. Также контролер сна отлично справляется с ролью умного будильника.

Умная зубная щетка «Oral-B Toothbrush»

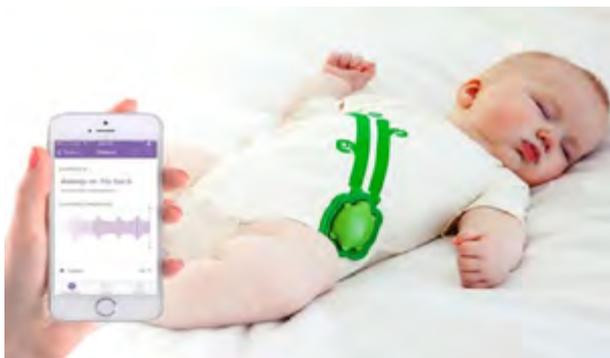


Зубная щетка Oral-B в процессе чистки зубов проследит правильность процесса чистки и, сработав синхронно с Вашим смартфоном, предоставит Вам в режиме реального времени все необходимые данные и рекомендации. Щетка контролирует чистоту зубов и, при необходимости, подает сигнал о том, что пора их почистить. Этот умный гаджет окажется очень полезной вещью для ребенка.

Обруч «Muse Headband»



Этот сенсорный обруч способен в течение нескольких минут расслабить и успокоить владельца этого гаджета. Обруч, работая синхронно с Вашим смартфоном, сосредотачивается на тренинге дыхания и релаксации. Это быстрый и максимально эффективный способ расслабления в любой ситуации: на улице, на работе, перед сном, при нервной перенагрузке. Уже после первого трехминутного сеанса чувствуется результат.

Mimo Baby Monitor

Производители умных гаджетов решили проявить заботу и о малышах. Созданный для них трекер, подобно заботливой маме, следит за состоянием ребенка: контролирует его дыхание, температуру тела, качество сна, положение тела. Обработанные и проанализированные данные отправляются родителям, попадая в их смартфон в режиме реального времени.

Умная кружка «Guenno Cup»

Количество потребляемой человеком жидкости на протяжении суток играет огромное значение для здоровья организма. Ведь нехватка воды в организме, особенно в жаркие дни, может негативно сказаться на общем состоянии человека. Умная кружка контролирует дневное потребление жидкости, измеряет температуру воды, следит за ее чистотой, а при необходимости очистки подает сигнал. Владелец кружки может установить цель потребления воды.

Умный коврик для йоги «SmartMat»

Meet SmartMat

«Умственные способности» коврика проявляются в том, что он может подстроиться под Ваше тело, изучив его размеры, уровень физической подготовки и возможные ограничения. Только после анализа всех полученных данных коврик при помощи голосовых команд обеспечивает проведение занятий йогой. Автономный режим работы возможен в течение 6 часов.

Умная подушка «Darma Sit Smart»



В моменты бездействия тело человека расслабляется и зачастую принимает неправильную позу. Умная подушка от Darma научит правильно сидеть без вреда для здоровья. После того, как Вы расположились на подушке в сидячем положении, она начинает сбор информации: время сидения, работы сердца и легких. Затем, анализируя Вашу позу, дает рекомендации по поводу Вашей осанки и вредных привычек.

Биосенсоры и приложения по управлению заболеваниями

Следующая волна инноваций среди носимых устройств фокусируется на выявлении различных медицинских параметров и жизненных показателей. Эту функцию выполняют биосенсоры, которые собирают информацию о различных параметрах здоровья, таких как давление, температура, пульс, ЭКГ, концентрация глюкозы и уровень кислорода в крови, жировые отложения, и передают эти данные беспроводным путем в мобильные приложения на телефон, планшет, компьютер.

Биосенсоры и мобильные приложения к ним предоставляют информацию о заболеваниях и состоянии пациента в данный момент времени, напоминают о необходимости принять лекарство и сообщают о необходимости оказания медицинской помощи.

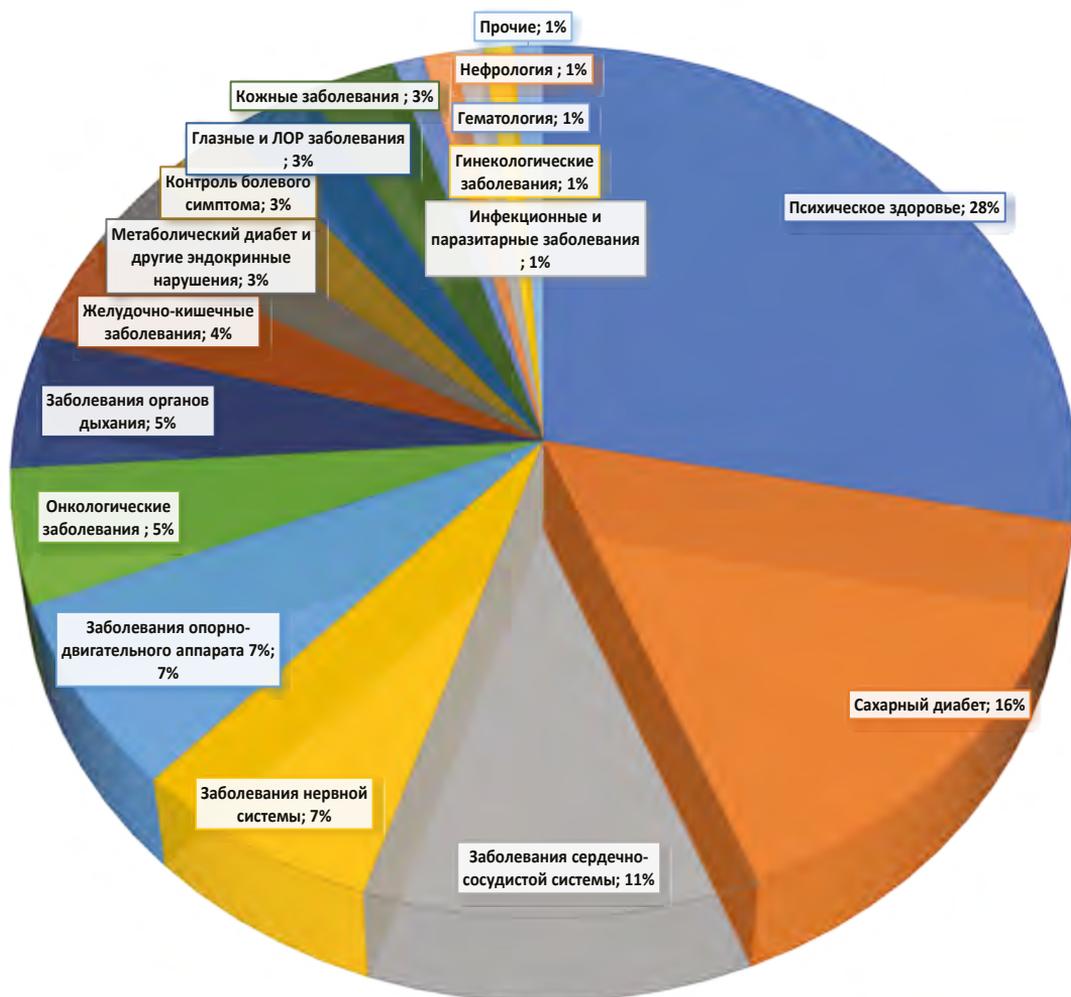
Среди заболеваний можно выделить пять основных точек приложения рынка мобильных устройств: психические заболевания, сахарный диабет, болезни сердца и сосудов, заболевания нервной системы, системные нарушения опорно-двигательного аппарата. Психическое здоровье является важнейшим направлением для мобильных приложений, причём треть из них посвящена аутизму. Достаточно много приложений посвящены депрессии, тревожности и синдрому дефицита внимания с гиперактивностью. Следующие по распространенности приложения относятся к таким заболеваниям, как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания нервной системы и опорно-двигательного аппарата.

Некоторые биомаркеры были первоначальными целями для разработки цифровых биомаркеров, которые могут отслеживать и обеспечивать эффективное лечение последствий заболевания. К таким маркерам относятся показатели движения и сна. С помощью этих биомаркеров можно отслеживать прогрессирование таких заболеваний, как эпилепсия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, ревматоидный артрит, остеохондроз и

др. Благодаря биосенсорам врачи и пациенты незамедлительно могут получить медицинскую помощь в случае необходимости.

С появлением в медицине цифровых технологий наблюдается переход от стационарного к персональному уходу, поскольку мобильные системы здравоохранения обеспечивают отличную поддержку и уход за пациентами независимо от их местоположения. Кроме того, благодаря появлению нового поколения медицинских устройств, медицинские работники могут эффективно и с меньшими затратами обслуживать пациентов.

Мобильность, автоматизация, простота использования биосенсоров и приложений по управлению заболеваниями являются основными факторами, которые игроки рынка цифровых гаджетов для медицины и здравоохранения используют для продвижения на рынок своего продукта.



Распределение мобильных приложений по управлению различными заболеваниями

Биохакинг

В последние годы, в первую очередь благодаря цифровым технологиям, появился новый термин «Биохакинг», пропагандирующий здоровый образ жизни на основе достижений молекулярной медицины. Биохакинг распространен во всем мире, но в последние годы пришел и в Россию.

Людей, которые следуют биохакингу, называют «биохакерами» (Хакер (англ. hacker, от to hack – обтёсывать, делать зарубку). Термин «хакер» имеет наибольшее значение в IT – технологиях для обозначения несанкционированных проникновений в компьютерные сети и сайты. Идеология биохакеров придерживается хакерских принципов относительно современных достижений в области биологии, считая, что современные инновации должны быть доступными для всех.

Биохакинг включает правильное питание и сон, оптимальную организацию рабочего дня, умеренную физическую нагрузку, контроль здоровья, прием витаминов, медитацию и работу с психологом.

Основные этапы биохакинга:

- Проведение диагностики организма.
- Консультация специалиста и составление персонализированной программы коррекции здоровья.
- Коррекция образа жизни.
- Повторная диагностика оценки результатов. В случае необходимости программа корректируется.

Для отслеживания жизненных показателей используются различные биосенсорные устройства, которые передают информацию специалисту для оценки и коррекции показателей здоровья. Различные мобильные приложения помогают выполнять ежедневные биохакинговые программы.

Таким образом, биохакинг – это использование последних достижений медицины и компьютерных технологий для коррекции работы различных систем организма. Это системный подход для совершенствования и управления собственным организмом.

Примеры биосенсоров и приложений по управлению заболеваниями
(<https://www.ixbt.com/live/smartwatch/17-gadzhetov-pomogayuschih-sledit-za-zdorovem-s-pomoschyu-smartfona.html>.)

Мобильный браслет «Embrace»



Мобильный браслет фиксирует момент наступления эпилептического припадка благодаря измерению гальванического заряда кожи, температуры тела и его положения в пространстве благодаря гироскопу. При начале припадка на смартфон опекуна пациента отправляется сигнал – в сообщении содержится информация о координатах пациента. Также очень важно отслеживать приступы эпилепсии в ночное время. Во время сна приступы эпилепсии приводят к внезапной смерти. Использование этих устройств позволит сократить число смертей во время приступа более чем в 2 раза. Кроме того, приложение сохраняет статистику о приступах, что позволяет выявлять их причины. Например, приступ часто развивается при занятиях спортом.

Электрокардиограф «CardioQVARK»



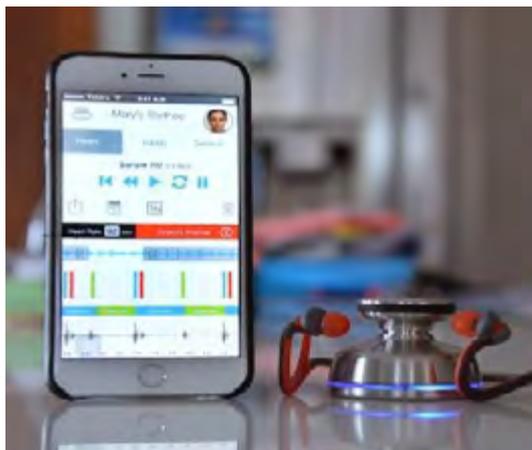
Мобильный гаджет позволяет самостоятельно записать ЭКГ в любое время и в любом месте. Для этого необходимо установить приложение на смартфон, надеть чехол и приложить пальцы к датчикам на устройстве. Далее кардиограмма отправляется на обработку врачу, который может не только проанализировать состояние сердечно-сосудистой системы, но и сравнить динамику и отследить реакцию на стресс, физическую нагрузку и лекарственные препараты и передать рекомендации пациенту.

Термометр «Kinsa Thermometer»



Электронный термометр, который подключается к смартфону и передает данные о температуре тела на облачный сервер — к нему можно дать доступ своему врачу. Гаджет можно использовать для измерения температуры тела как у взрослых людей, так и у детей.

Стетоскоп «Stethee»



Беспроводной стетоскоп Stethee предназначен для персонального использования пациентом в домашних условиях. Устройство нужно приложить к груди и нажать кнопку, результат передается на смартфон в приложение. Если пользователю нужно обратиться к врачу, то устройство начнет мигать.

Глюкометр «OneTouch VerioSyng»



Мобильный глюкометр «OneTouch VerioSyng» позволяет быстро измерить уровень глюкозы в крови. В подключаемое к iPhone или iPad устройство вставляется тестовая полоска с каплей крови, после чего осуществляется анализ. Данные затем выводятся на дисплей и сохраняются в мобильном приложении, которое позволяет вести мониторинг потребляемых углеводов, вводимого инсулина и уровня глюкозы у диабетиков.

Анализатор дыхания «AirSonea»



Устройство позволяет анализировать дыхание для отслеживания симптомов астмы и предупреждения приступов. Для сбора данных пациенту нужно приложить гаджет к шее и просто дышать. AirSonea записывает частоту дыханий, что позволяет понять, что стало причиной приступа в каждом конкретном случае, а также может посылать напоминания о приеме лекарств и передавать информацию родственникам или лечащему врачу пациента.

Телемедицина

К термину «Телемедицина» относится использование цифровых и телекоммуникационных технологий для обмена медицинской информацией.

Развитие телемедицины в мировой практике, в первую очередь, перспективно для таких стран, где имеются отдаленные районы, недоступные для традиционной медицинской помощи. Первой такой страной стала Норвегия. Далее на практические рельсы телемедицина была поставлена во Франции применительно к морьям гражданского и военного флотов.

Сегодня телемедицина активно развивается в различных странах. Это один из наиболее быстро растущих сегментов здравоохранения в мире. Под эгидой Всемирной организации здравоохранения разрабатывается масштабный проект создания всемирной сети телекоммуникаций в медицине, который включает в себя электронный обмен научной информацией, организацию совещаний, видеоконференций, дискуссий. К международным сетям медицинских телекоммуникаций относятся системы «Satellife», направленная на распространение медицинских знаний в развивающихся странах и подготовку кадров, а также «Planet Heres» – система научных телекоммуникаций, международной научной экспертизы и координации научных программ, организованная ВОЗ.

Сегодня в мире известно около 250 международных проектов, направленных на развитие различных аспектов телемедицины: от скорой помощи (проект NECTOR) до проведения лечения на дому (проект HOMER-D). Одной из главных задач этих проектов является разработка методов приема и передачи информации от пациента и врачу. Много образовательных и аналитических проектов.

Учитывая огромную территорию Российской Федерации, неоднородную по плотности населения, важность развития телемедицины не вызывает сомнения. Развитию телемедицины в России способствует Федеральный закон от 29.07.2017 N 242-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросам применения информационных технологий в сфере охраны здоровья», вступивший в силу 1 января 2018 года. Впервые в истории российской медицины врачам разрешено оказывать медицинскую помощь с использованием телемедицинских консультаций, консилиумов, дистанционного мониторинга.

При первом обращении пациента к врачу в формате телеконсультации к пациенту прикрепляется врач по профилю заболевания и назначается очная встреча. После очного посещения устанавливается возможность дистанционного наблюдения за состоянием здоровья пациента лечащим врачом, и пациент может обращаться к своему лечащему врачу заочно. Для идентификации участников планируется использовать единую систему идентификации и аутентификации (ЕСИА), информационный обмен будет осуществляться с помощью единой системы межведомственного электронного взаимодействия.

Благодаря телемедицинским технологиям появляются новые перспективные возможности медицины:

- дистанционное медицинское консультирование;
- диагностика и виртуальное обследование;
- экспертное медицинское мнение;
- уточнение медицинского диагноза и сопровождение лечения пациентов;
- дистанционная профилактика и реабилитация пациентов.

Лечащий врач может выписывать пациенту как обычные, так и электронные рецепты, в том числе препараты, содержащие наркотические или психотропные вещества.

Примером таких телеконсультаций может служить мобильное приложение «Яндекс. Здоровье», запущенное в 2016 году. Это приложение предоставляет возможность получения онлайн-консультаций от разных врачей с помощью видеоконференций. Другим примером компании, оказывающей услуги в области телемедицины, является компания Doc+. В декабре 2017 года был запущен телемедицинский проект «Модуль здоровья», на котором можно пройти первичное обследование и удаленно проконсультироваться с врачом.

В 2018 году был запущен сервис телемедицины компании MyDoc. От конкурентов сервис отличается возможностью выбора категории врача (врач-специалист, врач квалификационной категории, врач с ученой степенью). На сайте есть 2 приложения (iOS и Android), представлены более 20 специализаций врачей (в том числе такие, как аритмолог, флеболог, миколог, кардиолог), а также возможность записаться на очный прием к врачу или на сдачу анализов и медицинское обследование.

К основным направлениям телемедицины относятся:

Телемедицинские консультации	<p>Проводятся путём передачи медицинской информации по телекоммуникационным каналам. Консультации могут проводиться как в «отложенном» режиме, так и в режиме реального времени.</p> <p>Телемедицинские консультации в «отложенном» режиме – наиболее дешёвый и простой способ организации консультации на расстоянии путём передачи медицинской информации по электронной почте. Он мало подходит для экстренных случаев, однако малозатратен и весьма эффективен при надлежащем организационном обеспечении. Телемедицинские консультации в режиме реального времени проводятся с использованием широкополосных каналов связи и видеоаппаратуры, что позволяет обеспечить непосредственное общение пациента с лечащим врачом. Наиболее сложные случаи могут обсуждаться консилиумом врачей из разных медицинских центров. Считается, что дистанционная видеоконсультация гораздо дешевле физического посещения пациентом врача – в зависимости от расстояния соотношение затрат может составлять до 50 раз в пользу телемедицины. Телемедицинские системы позволяют организовать диалог с врачом-экспертом (видеоконференцию) на любом расстоянии и передать практически всю необходимую для квалифицированного заключения медицинскую информацию (выписки из истории болезни, рентгенограммы, компьютерные томограммы, результаты УЗИ и т. д.).</p>
Телеобучение	<p>Проведение семинаров, лекций, хирургических операций, конференций с использованием телекоммуникационного оборудования. Во время таких лекций преподаватель может иметь интерактивный контакт с аудиторией. В результате использования таких технологий у врача появилась реальная возможность непрерывного профессионального образования без отрыва от места работы. Лекции, как и видеоконсультации могут проходить в многоточечном режиме. Таким образом, лекция может быть прочитана сразу для слушателей из разных стран.</p>
Домашняя телемедицина	<p>Телемедицинские системы применяются для дистанционного наблюдения за пациентами, страдающими хроническими заболеваниями и оказания медицинской помощи. Из дома пациента специальное телемедицинское оборудование осуществляет сбор и передачу медицинских данных пациента в отдаленный телемедицинский центр для дальнейшей обработки специалистами. Это важно, например, для больных с сердечной недостаточностью, нуждающихся в регулярных и частых обследованиях. Комплексы, включающие датчики, измеряющие температуру тела, давление крови, парциальное давление кислорода, ЭКГ и функции дыхания, соединены с настольным монитором, который, в свою очередь, автоматически отправляет данные в телемедицинский центр.</p>
Системы дистанционного биомониторинга для промышленных предприятий	<p>Телемедицинские системы динамического наблюдения применяются на промышленных предприятиях для контроля состояния здоровья работников (например, операторов на атомных электростанциях) без отрыва от основной деятельности. С этой целью интегрируют биосенсорные датчики в одежду, различные аксессуары, мобильные телефоны. Например, жилет с набором биодатчиков, регистрирующих ЭКГ, артериальное давление и ряд других пара-</p>

	метров, или мобильный телефон с возможностью регистрации ЭКГ и отправки её средствами GPRS в медицинский центр, а также с возможностью определения координат пациента в случае возникновения угроз жизни. С помощью телемедицинских систем возможна организация медицинского осмотра (например, водителей, шахтеров, сотрудников, работающих в сложных климатических условиях и вахтовым методом) перед допуском к профессиональной деятельности.
Негласный контроль состояния здоровья личного состава	С целью скрытого наблюдения за сотрудниками на рабочем месте или в жилище устанавливается аппаратура, способная бесконтактным способом измерять температуру тела, ЭКГ и ЭЭГ. На основании этих параметров можно оценить функциональное состояние организма человека. Соответственно организуются основные и резервные ситуационные центры, где обрабатывается поступающая информация.
Мобильные телемедицинские комплексы	Мобильные диагностические комплексы можно использовать в отсутствие телемедицинских кабинетов и центров, непосредственно там, где возникла необходимость: в машинах скорой помощи, удалённых больницах, бригадах медицины катастроф и санитарной авиации, медицинских формированиях ведомств по чрезвычайным ситуациям и обороне. Современный мобильный телемедицинский комплекс объединяет в себе мощный компьютер, легко сопрягаемый с разнообразным медицинским оборудованием, средства ближней и дальней беспроводной связи, средства видеоконференции и средства IP-вещания.

Таким образом, телемедицина экономит финансовые средства и повышает качество медицинской помощи. К 2020 году большинство медицинских организаций будут применять телемедицинские услуги. Они будут включены в систему ОМС. Уже возможно включение услуг телемедицины в социальные программы работников промышленных предприятий (ДМС), а также оказание платных услуг. Стоимость телемедицинских услуг в среднем на 30% ниже очного приема у любого медицинского специалиста. При этом за счет привлечения врачей федеральных клиник и многофункциональных центров, активного использования технологий «экспертного медицинского мнения» и «медицинских консилиумов» качество медицинского обслуживания повышается.

Блокчейн-технологии

Медицину будущего невозможно представить в отрыве от активно развивающихся в настоящее время новых информационных технологий - «блокчейн-технологий» (от англ. Block chain – цепочка блоков), представляющих собой распределённую базу данных. При этом блоки хранения информации не подключены к общему серверу, что делает данные технологии уникальными. К основным принципам можно отнести тот факт, что копии

всех данных хранятся в различных блоках, принадлежащие разным участникам системы, а все операции, проводимые в данной системе, открыты и доступны всем участникам. На основании этого информационные ресурсы, построенные на основе блокчейн – технологий, являются наиболее надежными.

Несмотря на то, что блокчейн-технологии, в первую очередь, ассоциируются с криптовалютой «биткойн», на самом деле уже сегодня эта технология применяется и в других сферах деятельности.

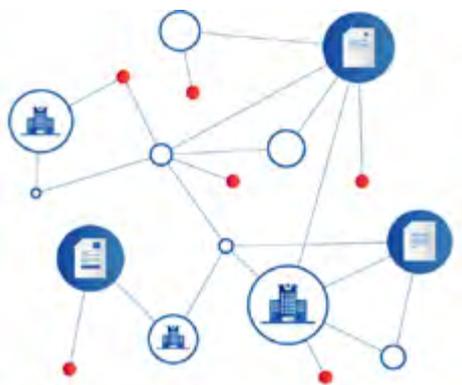
Уже никто не сомневается в возможном использовании перспективных блокчейн-технологий в медицине. Одним из возможных использований блокчейн-технологии в медицине является создание электронной базы медицинской документации. Сегодня медицинский документооборот организован в каждом конкретном учреждении, медицинские карты хранятся в разных организациях и архивах. Электронный медицинский ресурс на основе блокчейн-технологий дает возможность создания единой от рождения до смерти медицинской карты конкретного пациента, в ней будет находиться вся персональная информация о человеке, которую невозможно изменить или фальсифицировать.

Также блокчейн-технологии будут перспективны как массивное хранилище генетической и протеомной информации всего населения земного шара, что позволит создать единую базу данных. Такого рода проекты не только являются эффективными и масштабными, но и транснациональными.

Искусственный интеллект

Последние пять лет искусственный интеллект молниеносно проникает во всех сферы деятельности человека, в самые перспективные научные области. 2017 год ознаменовался окончательной победой искусственного интеллекта над человеком в стратегических играх, таких как го, покер, некоторых компьютерных стратегиях. Все больше успехов машины демонстрируют в синтезе речи, распознавании изображений, видео. Уже к декабрю 2017 года самоуправляемые автомобили от Uber наездили по дорогам 2 млн миль (около 3,2 млн километров).

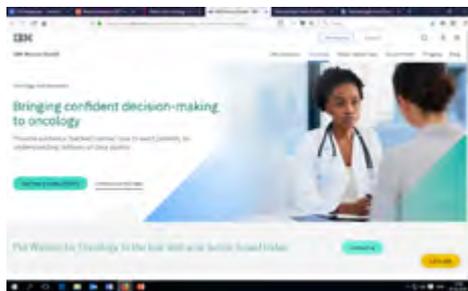
И, конечно, такие важные алгоритмы не обошли стороной медицину. Среди успехов 2017 года: алгоритм, разработанный учёными из Стэнфорда, научился выявлять рак кожи у пациентов. Другая группа исследователей



Блокчейн – технологии в медицине – это распределенная база данных

Медицина будущего.

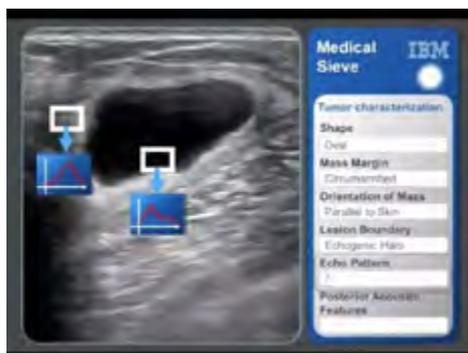
Персонализированная медицина: опыт прошлого, реалии завтрашнего дня



Программа IBM Watson для онкологии

интеллекта к возможностям человека и их интеграции, которая реализована природой человека;

– создание искусственного разума, представляющего собой интеграцию уже созданных систем искусственного интеллекта в единую систему, способную решать проблемы человечества.



Программа IBM Medical Sieve – оценка результатов МРТ, рентгеновских снимков, кардиограмм

из того же университета представила систему, которая способна определять нарушения в работе сердца (аритмию) по ЭКГ с большим успехом, чем кардиолог.

В целом развитие искусственного интеллекта в мире проходит по двум основным направлениям:

– решение проблем, связанных с приближением специализированных систем искусственного интел-

Последние исследования в области медицины в той или иной степени связаны с развитием искусственного интеллекта. Причем особенно активно развитие искусственного интеллекта идет по двум базовым направлениям. Наиболее проработанным на сегодня является направление по проектированию виртуального ассистента человека. Самая продвинутая система – это IBM Watson for Oncology. IBM Watson – суперкомпьютер, умеющий отвечать на вопросы, сформулированные на естественном языке (то есть

не на языке программирования). У него есть доступ к различным источникам данных: энциклопедиям, базам научных статей, антологиям знаний. Благодаря огромным вычислительным мощностям он выдаёт максимально точный ответ на заданный вопрос. Эта система обучена таким образом, что с вероятностью до 94% может определить наличие онкологического заболевания и его локализацию.

Программа IBM Medical Sieve (Медикел Сейв – сито) (в стадии разработки) будет оценивать результаты МРТ, рентгеновских снимков, кардиограмм. Врачу нужно потратить значительно больше времени на изучение картинки, чем системе искусственного интеллекта. При этом точность компьютерного анализа в среднем выше, а на постановку одного диагноза времени затрачивается меньше. Более того, за счёт уменьшения количе-



Программы, обеспечивающие условия домашнего стационара – Sensely (iOS, Android) – приложение медсестра

ства времени на распознавание и обработку данных может быть обслужено больше пациентов.

Следующая сфера применения искусственного интеллекта в медицине – это программы, обеспечивающие условия домашнего стационара. К примеру, Sensely (iOS, Android) – это приложение медсестра. Виртуальная сестра поговорит с Вами и выдаст краткую справку по симптомам заболевания, напомнит о приеме лекарств или процедурах. Аналогичные исследования проводятся в интересах развития и повышения эффективности восстановительной медицины.

Ученые активно развивают идею использования искусственного интеллекта для повышения качества проводимых анализов. Так, сотрудники Калифорнийского университета Лос-Анжелеса разработали инновационный алгоритм по выявлению злокачественных клеток. Результаты исследований опубликованы в журнале *Scientific Reports*. В рамках разработанного метода активно используется микроскоп нового типа и искусственный интеллект, анализирующий полученную информацию. В разработке используются наносекундные лазерные импульсные и аналогово-цифровой преобразователь, которые позволяют фиксировать изображения сотен тысяч клеток крови в секунду

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой книге рассмотрена концепция медицины будущего, какой она может быть и какие предпосылки для этого есть уже сегодня. Все люди уникальны. Наше здоровье определяется нашими генами в сочетании с нашим образом жизни и факторами окружающей среды. Путем анализа информации о нашем геноме можно определить индивидуальный риск развития заболевания, выявить болезнь раньше, чем она начала проявлять себя, можно определить наиболее эффективные мероприятия, будь то лекарства, образ жизни, или даже простые изменения в диете, чтобы болезнь как можно дольше не наступила.

В 1990 году был объявлен проект «Геном человека», который дал представление о том, что наше здоровье зашифровано в геноме. Это был дорогостоящий проект. Сегодня с появлением новых технологий секвенирования ДНК стоимость исследований резко упала. В сочетании с высокоскоростными вычислениями и базами данных, необходимых для анализа, можно рассматривать эту технологию как часть рутинного здравоохранения.

Благодаря внедрению генетических знаний в медицинскую науку разработаны точные, эффективные и в значительной степени универсальные методы диагностики наследственных болезней на любой стадии онтогенеза, в том числе и до рождения (пренатальная диагностика); заложены экспериментальные и клинические основы генной терапии наследственных и ненаследственных болезней. На основе данных об индивидуальной генетической и биохимической уникальности каждого человека начаты исследования по фармакогенетике – анализу индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам и по фармакогеномике – использованию данных геномики для разработки основ индивидуальной терапии и направленному созданию новых лекарств, специфически влияющих на отдельные звенья патологического процесса. Активно разрабатываются молекулярные основы профилактической (предиктивной) медицины, основу которой составляет тестирование генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям, в первую очередь, таким широко распространенным как атеросклероз, диабет, инфаркт миокарда, гипертония и прочие. Досимптоматическое выявление индивидов групп высокого риска по мультифакториальной патологии и ее первичная профилактика являются основными задачами предиктивной (предсказательной) медицины. Концепция персонализированной медицины позволит фармацевтическим компаниям разрабатывать более эффективные лекарства с меньшим количеством побочных эффектов. Врачи получат доступ к генетическим профилям своих пациентов, что позволит им использовать существующие лекарства более эффективно и безопасно, а люди смогут лучше управлять своим здоровьем.

Однако, до сих пор еще нет ответов на многие вопросы, которые стояли перед исследователями прошлого. Существует большое количество фактов, гипотез и данных, позволяющих достаточно полно ответить на них. Истинное понимание персонализированной медицины – как ее многообещающих перспектив, так и побочных явлений – зависит от развития молекулярной медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Белушкина Н.Н., Чемезов А.С., Пальцев М.А.* Генетические исследования мультифакториальных заболеваний в концепции персонализированной медицины. Профилактическая медицина. 2019; 22(3):26-30. <https://doi.org/10.17116/profmed20192203126>
2. *Белушкина Н.Н., Чемезов А.С., Пальцев М.А.* Персонализированная медицина и организация гериатрической помощи населению. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2019; 27 (3); 227-230 <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2019-27-3-227-230>
3. *Бодрова Т.А., Костюшев Д.С., Антонова Е.Н., Гнатенко Д.А., Бочарова М.О., Лопухин Ю.М., Пальцев М.А., Сучков С.В.* Введение в предиктивно-превентивную медицину: опыт прошлого и реалии дня завтрашнего. Вестник РАМН, 2013, № 1, С.58-64.
4. *Киселев В.И., Пальцев М.А.* Регуляция активности генов и новые лекарственные средства. Вестник Российской Академии Наук, 2016, том 86, № 6, с. 512–518
5. *Пальцев М.А., Иванов А.А., Киселёв В.И.* От молекул болезни до молекул здоровья. Наука в России, 2006, № 1, С.23-28.
6. *Пальцев М.А.* (ред.). Биология стволовых клеток и клеточные технологии. В двух томах. М., «Медицина» «Шико», 2009
7. *Пальцев М.А., Залетаев Д.В.* (ред.). Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. М., «Медицина», 2009
8. *Пальцев М.А., Смирнов В.Н., Иванов А.А.* Стволовые клетки. Перспективы применения в медицине. Вестник РАН, 2009, № 11, С.1012-1019.
9. *Пальцев М.А.* (ред.). Введение в молекулярную диагностику. В 2-х томах., ОАО «Издательство «Медицина», 2010
10. *Пальцев М.А., Смирнов В.Н.* Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при негематологических заболеваниях. Издательство «Шико», 2012, 176с., издание второе, стереотипное.
11. *Пальцев М.А., Чемезов А.С., Линькова Н.С., Дробинцева А.О., Полякова В.О., Белушкина Н.Н., Кветной И.М.* Омиксные технологии: роль и значение для развития персонализированной медицины. Молекулярная медицина. 2019; 17 (4): 3–8. <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-04-01>
12. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Зуев В.А., Линькова Н.С., Кветная Т.В.* Нейродегенеративные заболевания. Молекулярные основы патогенеза, прижизненной персонифицированной диагностики и таргетной фармакотерапии. СПб, Эко-Вектор, 2019, 200С.
13. *Свон М.* Блокчейн. Схема новой экономики. Издательство «Олимп-Бизнес», М.2018, 234 С.
14. *Сучков С.В., Гнатенко Д.А., Костюшев Д.С., Крынский С.А., Пальцев М.А.* Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического

скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии. Вестник РАМН, 2013, № 1, С.65-71.

15. Сычев Д.А., Шуев Г.Н., Торбенков Е.С., Адриянова М.А. Персонализированная медицина: взгляд клинического фармаколога. *Consilium Medicum*. 2017; 19 (1): 61-68.

16. *Alonso-Betanzos A., Bolon-Canedo V.* Big-Data Analysis, Cluster Analysis, and Machine-Learning Approaches. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer international: Cham, Switzerland. 2018, V. 1065, P. 607-626. DOI: 10.1007/978-3-319-77932-4_37

17. Biobanking in the 21st century. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer-Verlag: Berlin. 2015, V. 864, 186 P. DOI: 10.1007/978-3-319-20579-3

18. *Bisui S., Misra S.C.* Personalized Medicine. *Encyclopedia of information science and technology*, 4th edition. 2018, P. 5901-5907. DOI: 10.4018/978-1-5225-2255-3.ch513

19. *Bodiroga V.N., Rukavina D., Pavelic K., Sander G.G.* Personalized Medicine: A New Medical and Social Challenge. *Europeanization and Globalization*. 2016, V.2, 278 P. DOI: 10.1007/978-3-319-39349-0

20. *Brivanlou A.H.* Human embryonic stem cells in development. *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Academic Press: San Diego., 2018, V. 129, 190 P.

21. *Cerrato P., Halamka J.* Population Medicine Versus Personalized Medicine. *Realizing the promise of precision medicine: the role of patient data, mobile technology, and consumer engagement*. 2018, P. 1-28. DOI: 10.1016/B978-0-12-811635-7.00001-4

22. *Chun H.J., Park K., Kim C.H., Khang G.* Novel biomaterials for regenerative medicine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer-Verlag: Singapore. 2018., V. 1077, 537 P. DOI: 10.1007/978-981-13-0947-2

23. *Civin C.I., Kingsbury T.J., Kim M., Fisher P.B.* Cancer Stem Cells. *Advances in Cancer Research*. Elsevier Academic Press: San Diego. 2019. V. 141. 253 P.

24. *Currie G., Delles C.* Precision Medicine and Personalized Medicine in Cardiovascular Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer international: Cham, Switzerland. 2018, V. 1065, P. 589-605. DOI: 10.1007/978-3-319-77932-4_36

25. *Dhawan D.* Omics Approaches Towards Transforming Personalized Medicine. *OMICS technologies and bio-engineering: towards improving quality of life*, v. 1: Emerging fields, animal and medical biotechnologies. Academic Press: London. 2018, P. 25-46. DOI: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00002-6

26. *Doherty G.J., Petruzzelli M., Beddowes E., Ahmad SS., Caldas C., Gilbertson R.J.* Cancer Treatment in the Genomic Era. *Annual Review of Biochemistry*. 2019, V. 88, P. 247-280. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-011840

27. *Durand C., Charbord P.* Stem cell biology and regenerative medicine. River Publishers Series in Research and Business Chronicles-Biotechnology and Medicine. River Publishers: Aalborg. 2015, V. 3, 727 P.

28. *Dutta P.K.* Chitin and chitosan for regenerative medicine. Springer Series on Polymer and Composite Materials. Springer India: New Delhi. 2016, 389 P. DOI: 10.1007/978-81-322-2511-9

29. *El Khamisy S.* Personalised Medicine: Lessons from Neurodegeneration to Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2017, V. 1007, 260 P. DOI: 10.1007/978-3-319-60733-7

30. *ElBadri N.* Advances in stem cell therapy: bench to bedside. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Humana Press: Totowa. 2017, 310 P. DOI: 10.1007/978-3-319-29149-9

31. *Facklam A.L., Volpatti L.R., Anderson D.G.* Biomaterials for Personalized Cell Therapy. Advanced materials. № 1902005. DOI: 10.1002/adma.201902005

32. *Fanos V.* Metabolomics and Microbiomics: Personalized Medicine from the Fetus to the Adult. Academic Press: London, 2016. 131 P.

33. *Fauza D.O., Bani M.* Fetal stem cells in regenerative medicine: principles and translational strategies. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Springer: Dordrecht. 2016, 453 P. DOI: 10.1007/978-1-4939-3483-6

34. *Ginsburg, G.S., Willard, H.F.* (Eds.) Genomic and Personalized Medicine. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2012; Volume 1–2

35. *Golubnitschaja O., Costigliola V.* EPMA. General report & recommendations in predictive, preventive and personalised medicine 2012: white paper of the European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine. EPMA J. 2012;3(1):14. <https://doi.org/10.1186/1878-5085-3-14>.

36. *Golubnitschaja O., Baban B., Boniolo G., W., Bubnov R., Kapalla M., Krapfenbaue K., Mozaffari M. S., Costigliola V.* Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation. The EPMA Journal. 2016. 7:23 DOI 10.1186/s13167-016-0072-4.

37. *Grech G., Grossman I.* Preventive and Predictive Genetics: Towards Personalised Medicine. Advances in Predictive Preventive and Personalised Medicine. Springer: Dordrecht. 2015, V.9, 378 P. DOI: 10.1007/978-3-319-15344-5

38. *Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Belousov S.I., Vasilyev A.V., Bukharova T.B., Leonov G.E., Galitsyna E.V., Goldshtein D.V., Chvalun S.N., Kulakov A.A., Paltsev M.A.* Influence of Molecular Characteristics of Chitosan on Properties of In situ Formed Scaffolds. BioNanoSci, 2017, Volume 7, (3), pp 492–495, <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0411-5>.

39. *Guest F.L., Guest P.C.* Point-of-Care Testing and Personalized Medicine for Metabolic Disorders. Methods in Molecular Biology. 2018., V. 1735, P. 105-114. DOI: 10.1007/978-1-4939-7614-0_6

40. *Hood L.* Systems biology and p4 medicine: past, present, and future. Rambam Maimonides Med. J. 2013; 4 (2): e0012. DOI: 10.5041/RMMJ.10112.

41. *Hood L., Tian Q.* Systems Approaches to Biology and Disease Enable Translational Systems Medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012; 10:181–185.
42. *Jain K.K.* Personalized Medicine. Decision Resources Inc. Waltham, MA, USA. 1998.
43. *Kim I.J.* Cancer Genetics and Genomics for Personalized Medicine. Pan Stanford Publishing: Singapore. 2017, 286 P. DOI: 10.1201/9781315364766
44. *Kosorok M.R., Moodie E.E.M.* Adaptive Treatment Strategies in Practice: Planning Trials and Analyzing Data for Personalized Medicine. Asa-Siam Series on Statistics and Applied Probability. Siam: Philadelphia, 2016, 348 P.
45. *Lee H.S.* Pathology in the Era of Personalized Medicine. Cancer genetics and genomics for personalized medicine. 2017, P. 227-238
46. *Li G.Q.* Bionic functional structures by femtosecond laser micro/nanofabrication technologies. Springer Theses-Recognizing Outstanding PhD Research. 2018, P. 1-19. DOI: 10.1007/978-981-13-0359-3_1
47. *Los M.J., Hudecki A., Wiechec E.* Stem cells and biomaterials for regenerative medicine. Academic Press: London. 2019, 229 P. DOI: 10.1016/C2016-0-03365-X
48. *Mangoni A.A.* Comprehensive Geriatric Assessment and Personalized Medicine. Practical Issues in Geriatrics. Springer international: Cham, Switzerland. 2018, P. 69-77. DOI: 10.1007/978-3-319-62503-4_7
49. *Martin U., Zweigerdt R., Gruh I.* Engineering and application of pluripotent stem cells. Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology. Springer international: Cham, Switzerland. 2018. V.163., 228 P. DOI: 10.1007/978-3-319-73591-7
50. *Nielsen J.* Systems Biology of Metabolism: A Driver for Developing Personalized and Precision Medicine. *Cell metabolism*. 2017; 25 (3): 572-579. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.02.002.
51. *Ramaswami R., Bayer R., Galea S.* Precision Medicine from a Public Health Perspective. Annual Review of Public Health. 2018, V. 39, P. 153-168. DOI: 10.1146/annurev-publhealth040617-014158
52. *Ruys A.J.* Alumina ceramics: biomedical and clinical applications. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. 2019, P. 255-281. DOI: 10.1016/B978-0-08-102442-3.00009-9
53. *Samal S.K., Dubruel P.* Cationic polymers in regenerative medicine. RSC Polymer Chemistry Series. Royal Soc Chemistry, Thomas Graham House: Cambridge. 2015, V.13, 618 P.
54. *Schmidt M.A., Goodwin T., Cuttino M.* Personalized Medicine in Space Flight, Part II: Personalized Precision Medicine Approaches. Academic Press: London. 2017, P. 655-672. DOI: 10.1016/B978-0-12-803506-1.00067-X
55. *Schork, N.J.* Artificial intelligence and personalized medicine. *Cancer Treat. Res.* 2019, 178, 265–283. DOI: 10.1007/978-3-030-16391-4_11

56. *Schork, N.J.* Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature* 2015, 520, 609–611.

57. *Schork, N.J.* Randomized clinical trials and personalized medicine: A commentary on deaton and cartwright. *Soc. Sci. Med.* 2018, 210, 71–73.

58. *Schork, N.J., Nazor, K.* Integrated genomic medicine: A paradigm for rare diseases and beyond. *Adv. Genet.* 2017, 97, 81–113. DOI: 10.1016/bs.adgen.2017.06.001

59. *Schork, N.J., Goetz, L.H.* Single-subject studies in translational nutrition research. *Annu. Rev. Nutr.* 2017, 37, 395–422.

60. *Shalabi H., Khuu H., Fry T.J., Shah N.N.* Cell-Based Therapies: A New Frontier of Personalized Medicine. Novel designs of early phase trials for cancer therapeutics. Academic Press: London. 2018, P. 175-191. DOI: 10.1016/B978-0-12-812512-0.00012-9

61. *Sharp S.K.* Science fiction film and television. Liverpool Univ Press: Liverpool. 2019, V. 12 (2), P. 259-262. DOI: 10.3828/sfftv.2019.15

62. *Turksen K.* Bioprinting in regenerative medicine. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine.* Humana Press Inc: Totowa. 2015, 140 P. DOI: 10.1007/978-3-319-21386-6

63. *Turksen K.* Cell biology and translational medicine, V. 1: Stem cells in regenerative medicine: advances and challenges. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer international: Cham, Switzerland. 2018., V. 1079, 168 P. DOI: 10.1007/978-3-319-93867-7

64. *Turksen K.* Cell biology and translational medicine, V. 5: Stem cells: translational science to therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019, V. 1144. 172 P. DOI: 10.1007/978-3-030-17589-4

65. *Vertes A.A., Qureshi N., Caplan A.I., Babiss L.E.* Stem cells in regenerative medicine: science, regulation and business strategies. John Wiley & Sons LTD: West Sussex. 2015. 756 P. DOI: 10.1002/9781118846193

66. *Vollmann J., Sandow V., Wascher S., Schildmann J.* Ethics of Personalised Medicine: Critical Perspectives. Routledge: Oxford. 2015, 285 P.

67. *Yan Q.* Translational Bioinformatics and Systems Biology Methods for Personalized Medicine. Academic Press: London. 2017, 171 P.

68. *Zhang L.G., Fisher J.P., Leong K.W.* 3D bioprinting and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine. Academic Press: London. 2015, 373 P.

Монография

М.А.Пальцев

**Медицина будущего.
Персонализированная медицина:
опыт прошлого,
реалии завтрашнего дня**

Формат 70x90 1/8

Гарнитура Times

Усл.-п. л. 22,23. Уч.-изд. л. 10,15

Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Верстка и печать – УНИД РАН

Отпечатано в экспериментальной цифровой типографии РАН

Издается по решению Научно-издательского совета

Российской академии наук (НИСО РАН)

и распространяется бесплатно