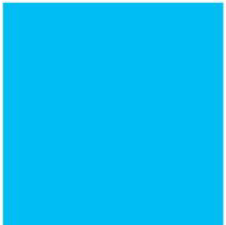
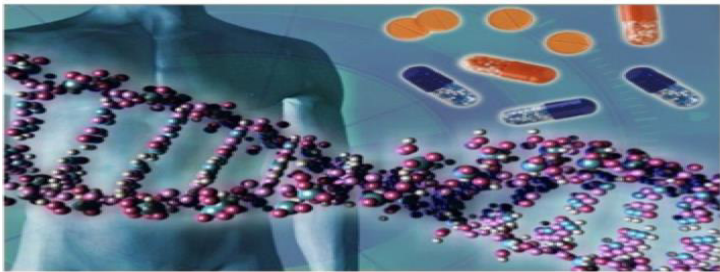


**РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени Н.И. Пирогова**

**Кафедра клинической лабораторной диагностики
ФДПО**

Щербо Сергей Николаевич

**ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА
КАК ОСНОВА МЕДИЦИНЫ 5П**



ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

- **УМЕНЬШЕНИЕ РАЗМЕРОВ, УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ, А ТАКЖЕ ДОЛИ РОБОТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ**
- **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕИНВАЗИВНЫХ ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**
- **МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ**
- **СОЗДАНИЕ ПАНЕЛЕЙ БИОМАРКЕРОВ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ИХ ПОДТИПОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОМИКСНЫХ И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ ПОДХОДОВ**
- **ПОНИМАНИЕ ВАЖНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ В ДИНАМИКЕ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОБАНКИНГА И МОБИЛЬНОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**
- **АКТИВНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОИНФОРМАЦИОННЫХ ПОДХОДОВ, БАНКОВ БИОМЕДИЦИНСКИХ ДАННЫХ**
- **ВНЕДРЕНИЕ В МЕДИЦИНУ СИСТЕМ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА (ИИ)**

Медицина XXI века:

Медицина 4 «П»

Предиктивная (предсказательная)

Превентивная (профилактическая)

Персонализированная (индивидуальная)

Партисипативная (пациент участник процесса, его информируют, обучают, помогают в выборе)

ЛЕРОЙ ГУД (Leroy Hood, США), 2008 г.

Медицина 5 «П»

Прецизионная

ЩЕРБО С.Н., РОССИЯ, Медицинский алфавит. Современная лаборатория №4, 2015 г.

Монография: Персонализированная медицина.

Медицина 5П. РУДН 2022 г

МОНОГРАФИЯ

«ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА»

ТОМ 3 «Медицина 5П»

3



Щербо Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова, профессор кафедры кожных и венерических болезней Медицинского института РУДН, президент Национальной ассоциации лабораторной, персонализированной и трансляционной медицины, вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики.



Щербо Дмитрий Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова.



МЕДИЦИНА 5П

С.Н. Щербо, Д.С. Щербо

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА

В семи томах



Том 3

С.Н. Щербо, Д.С. Щербо

МЕДИЦИНА 5П



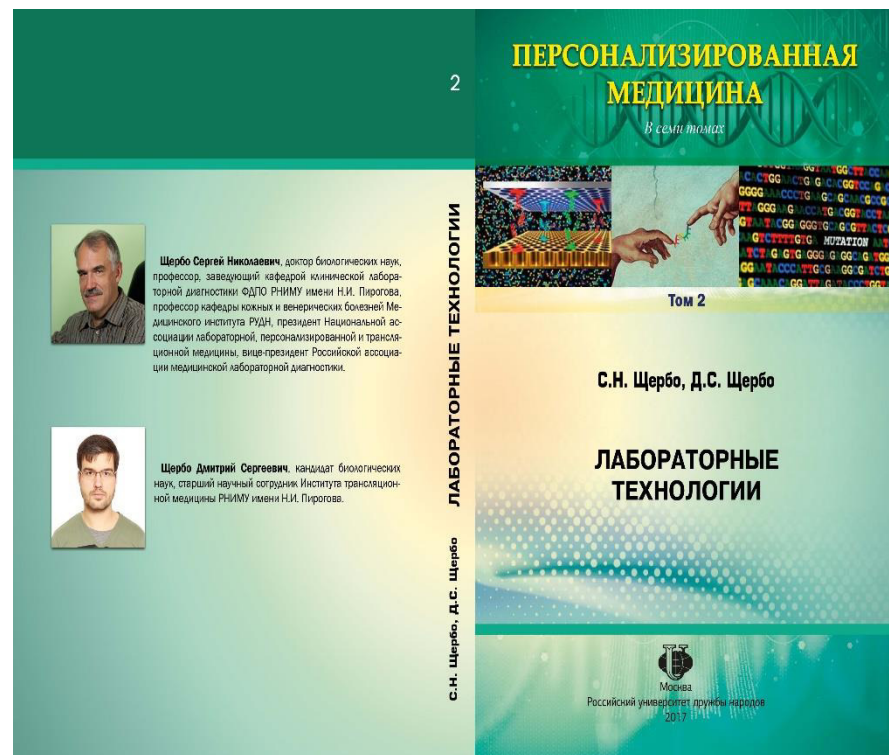
Москва

Российский университет дружбы народов
2022

МОНОГРАФИЯ

«ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА»

Вышли том 1 «Биологические основы» и
том 2 «Лабораторные технологии».



МЕДИЦИНА 5П

ИНТЕРНЕТ

**БЕСПРОВОДНЫЕ
СЕНСОРЫ**

**МОБИЛЬНЫЕ
ТЕЛЕФОНЫ**

**ОМИКСные
технологии и
интегральное
профилирование**

СЛИЯНИЕ

**СОЦИАЛЬНЫЕ
СЕТИ**

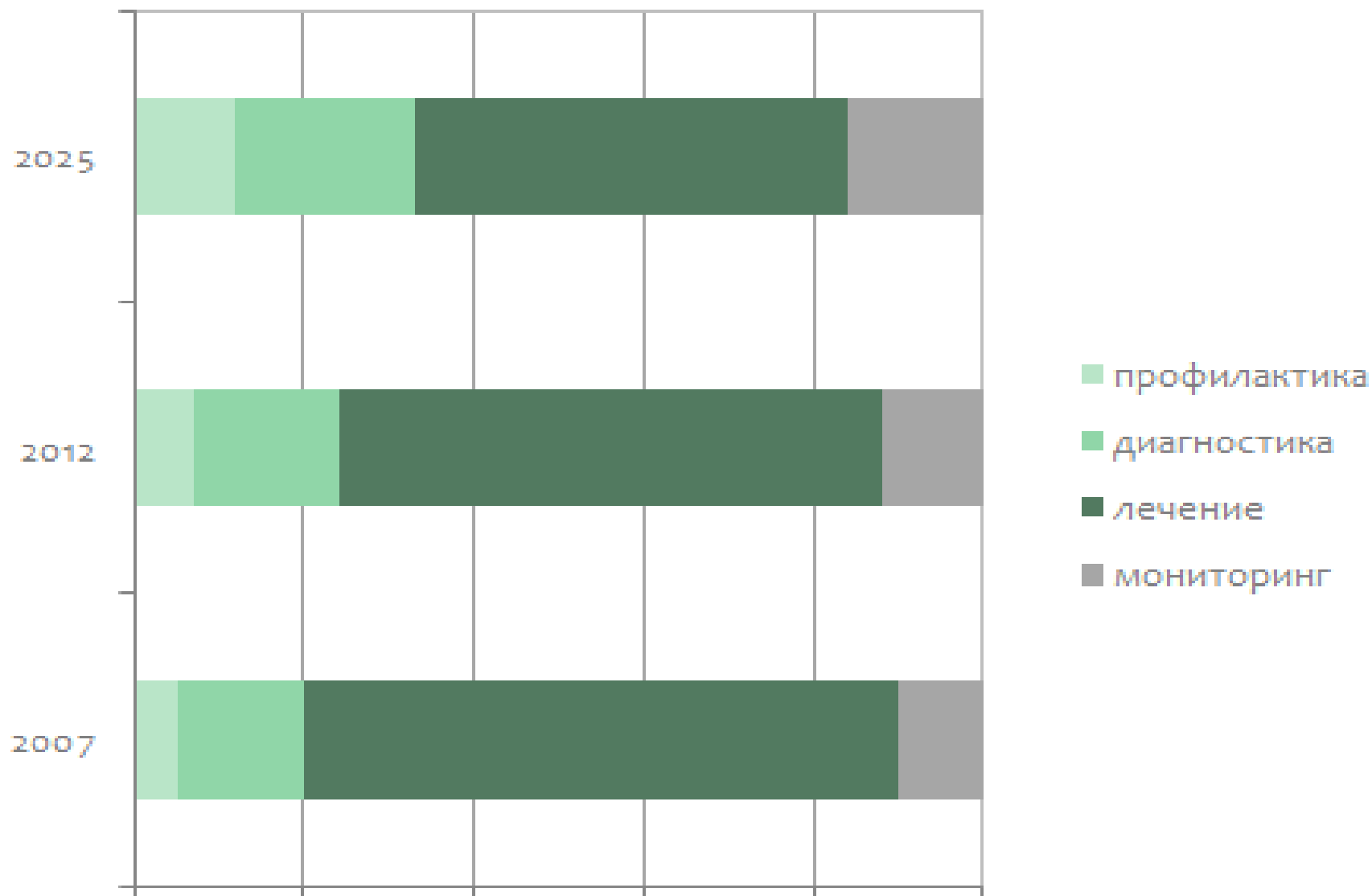
**ТЕХНОЛОГИИ
ВИЗУАЛЬНОГО
АНАЛИЗА**

**ИНФОРМАЦИОННЫЕ
И ОБЛАЧНЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ**

СТАРАЯ МЕДИЦИНА



Прогноз рынков здравоохранения



Основные перспективные лабораторные платформы медицины 5П

Генодиагностические технологии
(амплификация и секвенирование нуклеиновых кислот);

Микробиочипы;

Масс-спектрометрия;

Микрофлюидные технологии;

Проточная цитометрия, жидкостная биопсия;

**Анализ свободноциркулирующей
внеклеточной ДНК;**

Технологии мобильного здравоохранения.



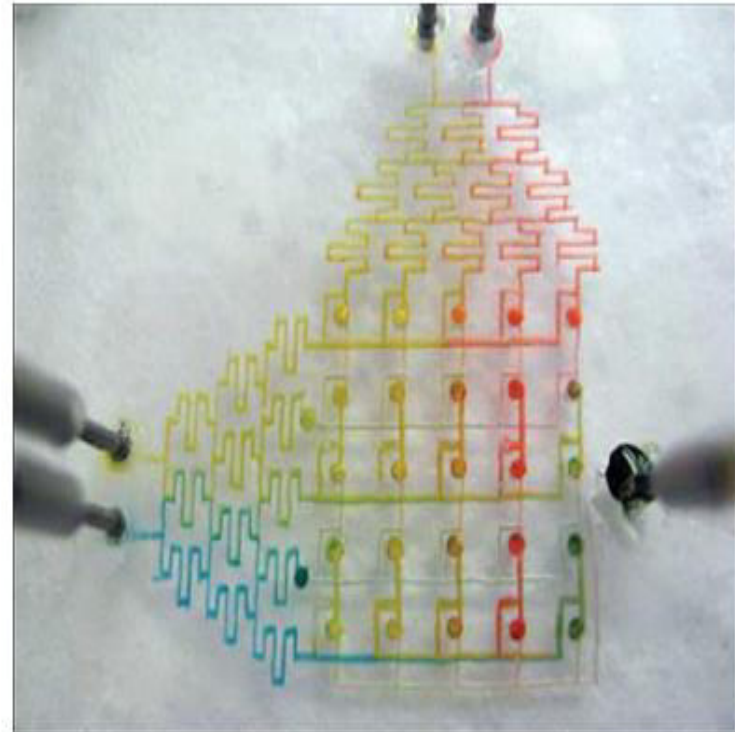
ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ МОБИЛЬНОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

- **Мобильные устройства мониторинга сахарного диабета.**
- **Применение мобильных телефонов в иммуноанализе.**
- **Микроскопия в диагностике онкологических заболеваний.**
- **Амплификационные технологии мобильного здравоохранения.**
- **Диагностика инфекционных и паразитарных заболеваний.**

**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА.
Т.2. Лабораторные технологии.**

Микрофлюидные системы для проведения мультиплексного анализа

Системы микроканалов и резервуаров с управляемым движением потоков для проведения многостадийного анализа



Миниатюризация позволяет локализовать на малой площади большое число участков с реагентами разной специфичности для проведения мультиплексного анализа

Платформы секвенирования третьего поколения

Портативные системы на микрофлюидной основе для молекулярной диагностики

Наименование системы	Gene Z	Spartan	Nanosphere Verigene	Nanomix Sensation	Quantu MDX Q-POC	Atlas Io	SNP Dx
Исходный образец	Капиллярная кровь	Букальный мазок	Клинический образец	Кровь из пальца	Кровь из пальца	Клинический образец	Слюна
Метод амплификации	LAMP	ПЦР	ПЦР	ПЦР	ПЦР	ПЦР	ПЦР
Детектирование	Флуоресценция	Оптическое	Золотые наночастицы	Кремневые нанотрубки	Нанопроволка	На основе электрохимии	Наночувствительный полевой транзистор
Анализатор /ридер	Настольный+смартфон	Настольный	Настольный	Портативный	Портативный	Настольный	Портативный
Длительность теста	30 мин	Менее 60 мин	2-3 часа	Несколько ко	10-15 мин	30 мин	30 мин

В медицине существует два главных тренда: использование больших данных и персонализированный подход.

В настоящее время увеличиваются объемы и сложность в обработке данных по различным биомаркерам (к 2025 г. секвенируют до ~40 экзабайт данных по геномам человека), происходит переход к персонализированным медицинским услугам и анализу ранних стадий заболевания.

По данным GenBank на протяжении последних 30 лет объемы данных о НП растут экспоненциально, а их обработка значительно отстает из-за недостатка биологических знаний и БИ алгоритмов. С ростом производительности квантовых компьютеров анализу могут быть подвергнуты и геномы человека.

Что такое «Персонализированная медицина»: результаты систематического обзора 683 исследований, в которых определялся этот термин

Schleiden et al. *BMC Medical Ethics* 2013, 14:55
<http://www.biomedcentral.com/1472-6939/14/55>

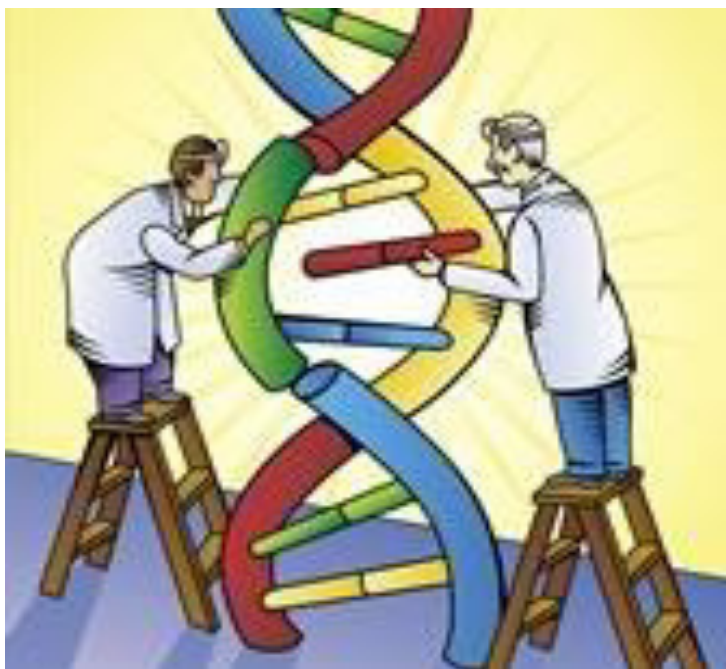


RESEARCH ARTICLE

Open Access

What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review

Sebastian Schleiden^{1*}, Corinna Klingler¹, Teresa Bertram¹, Wolf H Rogowski^{2,3} and Georg Marckmann¹



Шляйдген с соавт.
проанализировали **683**
медицинские статьи из БД
PubMed, содержащие
определения термина
«персонализированная
медицина».

Schleiden S et al. What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. // BMC Med Ethics. – 2013. – 14. – P. 55.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА

Итоговое определение

ПМ ищет пути улучшения **стратификации** **пациентов** и оптимизации времени и сроков их лечения благодаря использованию биологической информации на уровне молекулярных путей возникновения и развития заболевания (в частности, биомаркеров).

Первое массовое применение ПМ – разделение людей по группам крови

Качественное лабораторное исследование это:

- правильно выбранный тест
 - в правильное время
 - у правильного пациента
 - правильно выполнен и оформлен результат
 - корректная и своевременная интерпретация
 - верная рекомендация (что делать)
- назначение



Гален К.



Мудров М.Я.



Пирогов Н.И.



Боткин С.П.



Флоринский В.М.



Ослер У.



Уотсон Д.



Вентер Крейг



Ultima Genomics объявил в 2022 г. о платформе 100 \$ сиквенса

Первой о намерении секвенировать геном человека за \$100 заявила компания Illumina в 2017 году. В 2020-м такие же планы озвучила китайская фирма MGI. На сегодня стоимость одного генома упала ниже \$1000.

Стартап из США Ultima Genomics объявил в 2022 г. о привлечении финансирования для создания новой платформы UG 100, которая исключает проточную ячейку. Вместо нее используется кремниевая подложка на которую нанесены участки, связывания ДНК за счет электростатических сил. И подложка, и метод ее обработки широко используются в полупроводниковой индустрии и стоят недорого.

Цена генома в 2023 году (WGS)

данные Зубов В.В.



€199

<https://dantelabs.com/products/whole-genome-sequencing>



\$299

<https://nebula.org/whole-genome-sequencing-dna-test/>



\$399

<https://www.dnalinkseqlab.com/human-wgs-at-399/>



\$399

<https://sequencing.com/our-difference/whole-genome-sequencing>

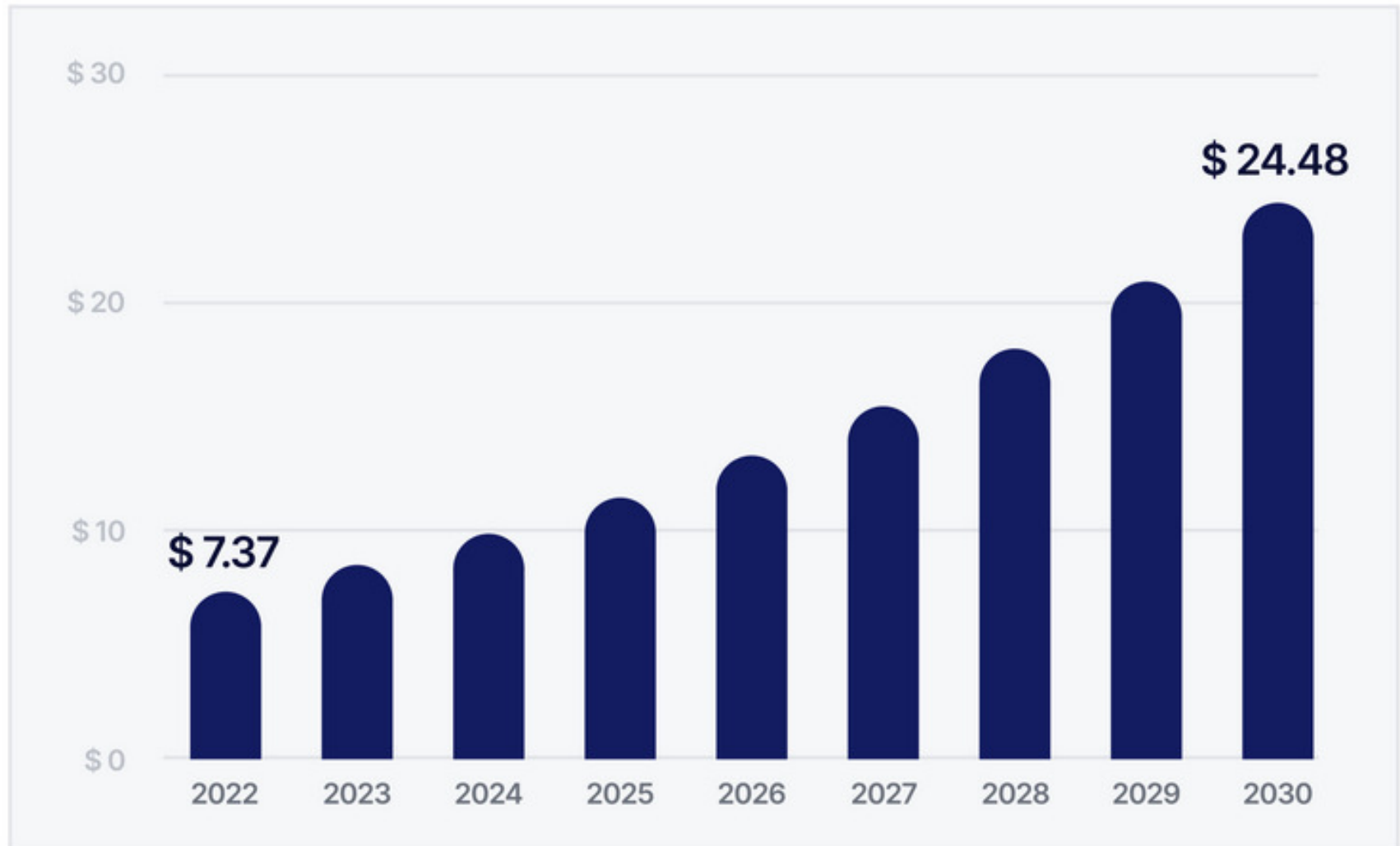


\$399

<http://www.yseq.net/>

Прогноз роста рынка NGS

NGS Market Size 2022 - 2030 (USD Billion)



*Source: <https://www.precedenceresearch.com/next-generation-sequencing-market>

<https://3billion.io/blog/whole-genome-sequencing>

Цена генома в России (данные Зубов В.В.)



70 000 ₺

<https://nextgenseq.tech/>



75 000 ₺

<https://www.skygen.com/katalog/sekvenirovanie/>



95 000 ₺

<https://genomed.ru/service/nasledstvennyye-zabolevaniya-i-hromosomnaya-patologiya/sekvenirovanie-genom>



99 000 ₺

<https://f-genetics.com/genome/>



99 900 ₺

<https://www.genotek.ru/full-genome/>



111 000 ₺

<https://atlas.ru/ru/wgs>



113 000 ₺

<https://genetico.ru/prices>

Референсные последовательности генома человека

2010 г. Hg19

2015 г. Hg 38

2022 г. T2T

Мозаичные конструкции • Искусственно огомозигоченные cell lines

Физически доступные референсы (gDNA, cell lines):

Genome in a Bottle Consortium

Platinum genomes illumina

YH China



Геном человека: окончательная победа

Спецвыпуск *Science* (апрель 2022) — посвящен установлению последовательности полного человеческого генома. Референсный геном человека

в 2000 году покрывал около 92%. В геноме человека содержится множество повторяющихся участков, особенно в гетерохроматине центромер и теломер. Консорциум *Telomere-to-Telomere* (T2T) (Рогаев Е.) сообщил о расшифровке недостающих 8%, сложнейших участков человеческого генома. Новая сборка генома человека T2T-CHM13, состоит из 3,055 миллиардов пар оснований. Консорциум заявил, что смог «заполнить бреши» на всех человеческих хромосомах, за исключением Y-хромосомы, исправили ряд ошибок, дополнили известную последовательность почти 200 миллионами пар оснований, среди которых предсказали 1956 генов, из которых 99 кодируют белки.

Международная исследовательская группа Telomere-to-Telomere в конце августа 2023 г. опубликовала научную работу: «Полная последовательность Y-хромосомы человека».

В Y-хромосоме идентифицировали 110 новых, ранее не известных генов. Итого их теперь 693 (583 гена определили в ходе прежних исследований). Из них 106 генов, включая 41 новый, кодируют белки. Расширяются наши возможности выяснить причины и механизмы развития тех или иных мужских заболеваний, разработки новых препаратов и методов лечения.

После определения генов задача выяснить, за что именно в организме отвечает каждый из них. Считается, что ген SRY открытый ранее, является ключевым для развития мужского пола. Вероятно, узнаем, как разные варианты какого-либо из этих генов влияют на возможность стать отцом, удастся определить генетические варианты, при которых зачатие ребенка естественным путем невозможно и семье сразу можно будет предложить вспомогательные репродуктивные технологии. Сможем выяснить роль генов Y-хромосомы в развитии онкологических заболеваний у мужчин, таких как рак мочевого пузыря и предстательной железы.

РАЗДЕЛ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

ILLUMINA

Флуоресцентное
секвенирование
Полногеномное
секвенирование
(WGS), секвенирование
геномов de novo,
теория эволюции,
происхождение человека.

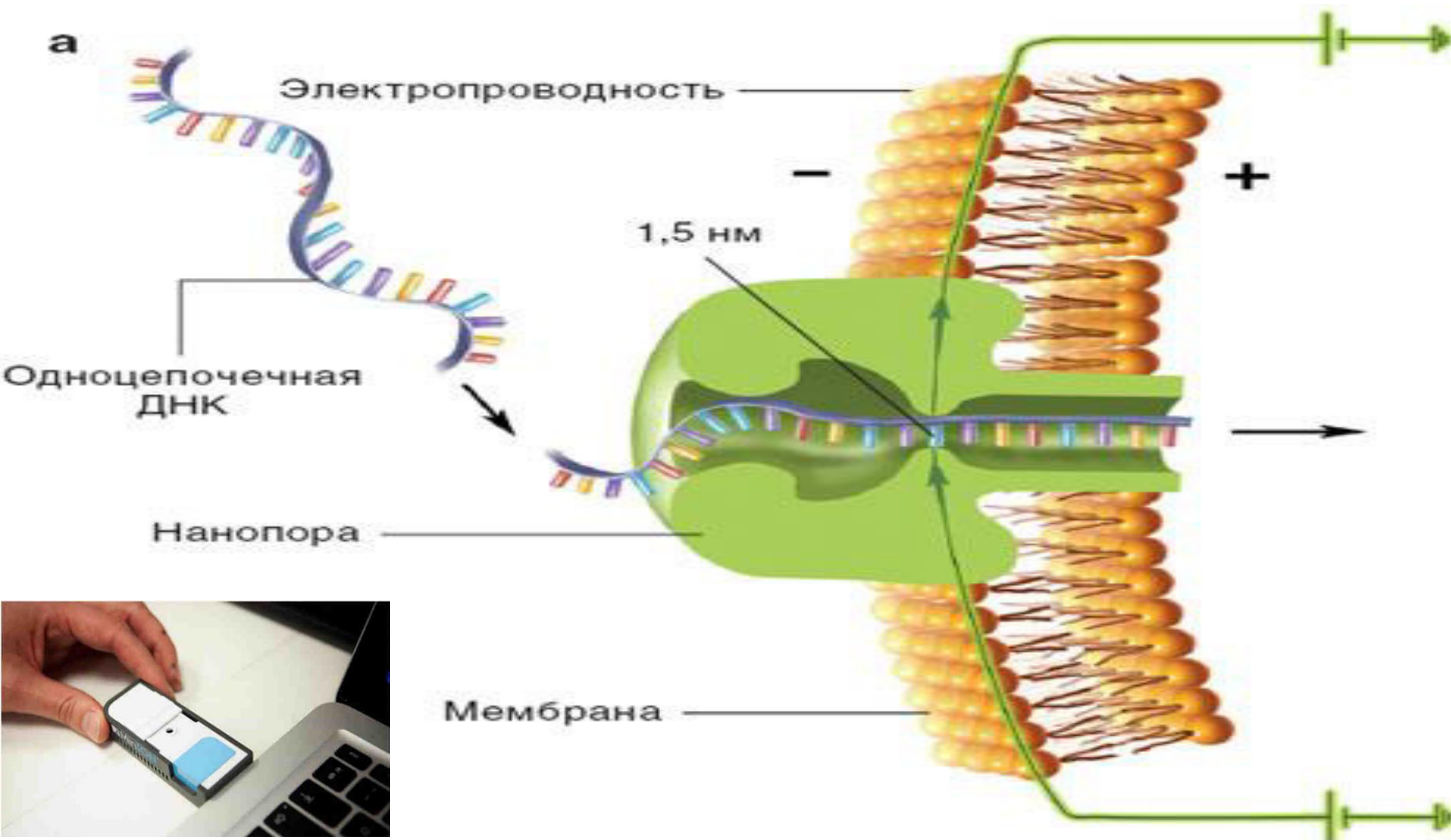
ThermoFisher Scientific

Полупроводниковое
секвенирование
Таргетное
секвенирование
WGS бактерий и вирусов,
медицинская, фармако и
этногенетика

Oxford NANOPORE

Нанопоровое секвенирование
Генодиагностика инфекционных болезней, WGS (CNV)

СИКВЕНС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОР





MinION



Вес – 78 г

Мощность – 1 Вт

Размеры – 105x23x33 мм

Количество нанопор – до 512

Интерфейс – USB 3.0 (до 5 Gbps)

Стоимость проточной ячейки - \$500...\$900

Производительность – 10...20 Gbp за 48 часов



GridIONx5

Вес – 10 кг

Мощность – 600 Вт

Размеры – 360x200x360 мм

Количество нанопор – до 512x5

Стоимость проточной ячейки - \$299...\$900

Производительность – 50...100 Gbp за 48 часов



Портативные высокопроизводительные секвенаторы PromethION — P2 и P2 Solo -создан **для широкого круга исследователей. Любой пользователь сможет самостоятельно и относительно дешево получать данные полногеномного секвенирования в режиме реального времени (до 190–380 геномов человека в год).** Используемая в P2 Solo технология позволяет выйти за рамки базового анализа ДНК, она также включает **транскриптомный и эпигенетический анализы на одной платформе.**



Oxford Nanopore — «не инвестируйте в приборы, инвестируйте в технологию».

Компания создает технологии секвенирования ДНК и РНК, предлагает быструю подготовку библиотек и получение результатов в режиме онлайн. Около четверти геномов коронавируса секвенируется на приборах Oxford Nanopore. Ячейки можно промывать и использовать несколько раз, пока в них есть живые поры, в режиме реального времени видно, что происходит с образцом при секвенировании и что-то скорректировать. Есть технология, которая заставляет возвратиться из нанопоры нежелательную для секвенирования НП (пора пропускает ДНК со скоростью 450 нуклеотидов в секунду). Современные реализации алгоритма позволяют секвенировать **отдельно только экзом**.

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА ФЕВРАЛЬ 2018

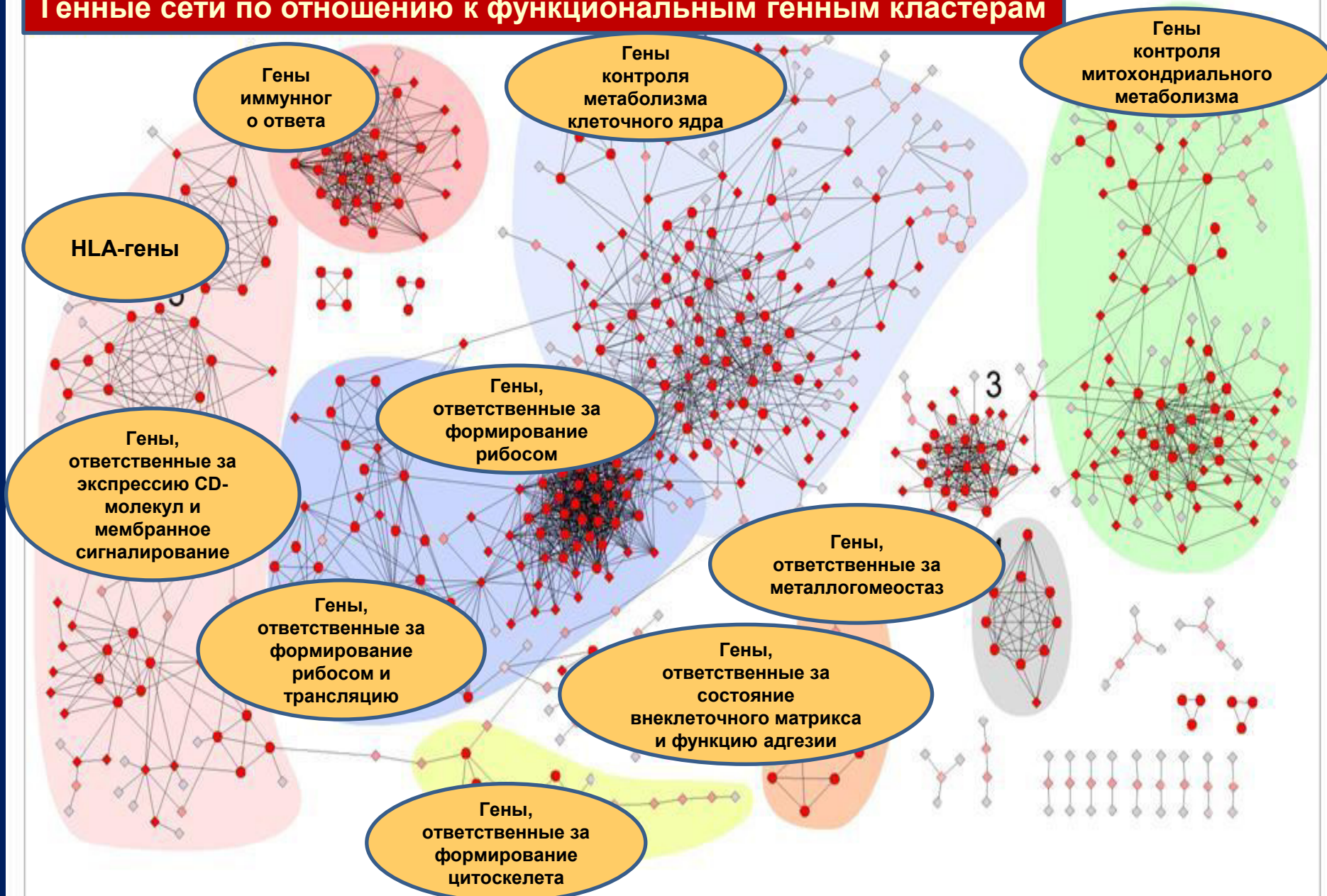
В статье, опубликованной в *Nature Biotechnology*, также описан поставленный с помощью MinION рекорд по самому длинному прочтению ДНК клеточной линии человека GM12878. В итоге получили 91,2 гигабайт данных, что соответствует 30-кратному покрытию генома. Длина более половины прочтенных фрагментов ДНК составила 100 тысяч п. о. и более.

Дополнительно исследователи показали, что с оптимизированным протоколом возможно определение последовательности ДНК **до 882 тысяч п. о.** Максимальная длина прочтения определяется только качеством выделения ДНК. После сравнения с референсным геномом линии GM12878, который был прочтен традиционными методами много раз, оказалось, что точность сборки приближается к 100%.

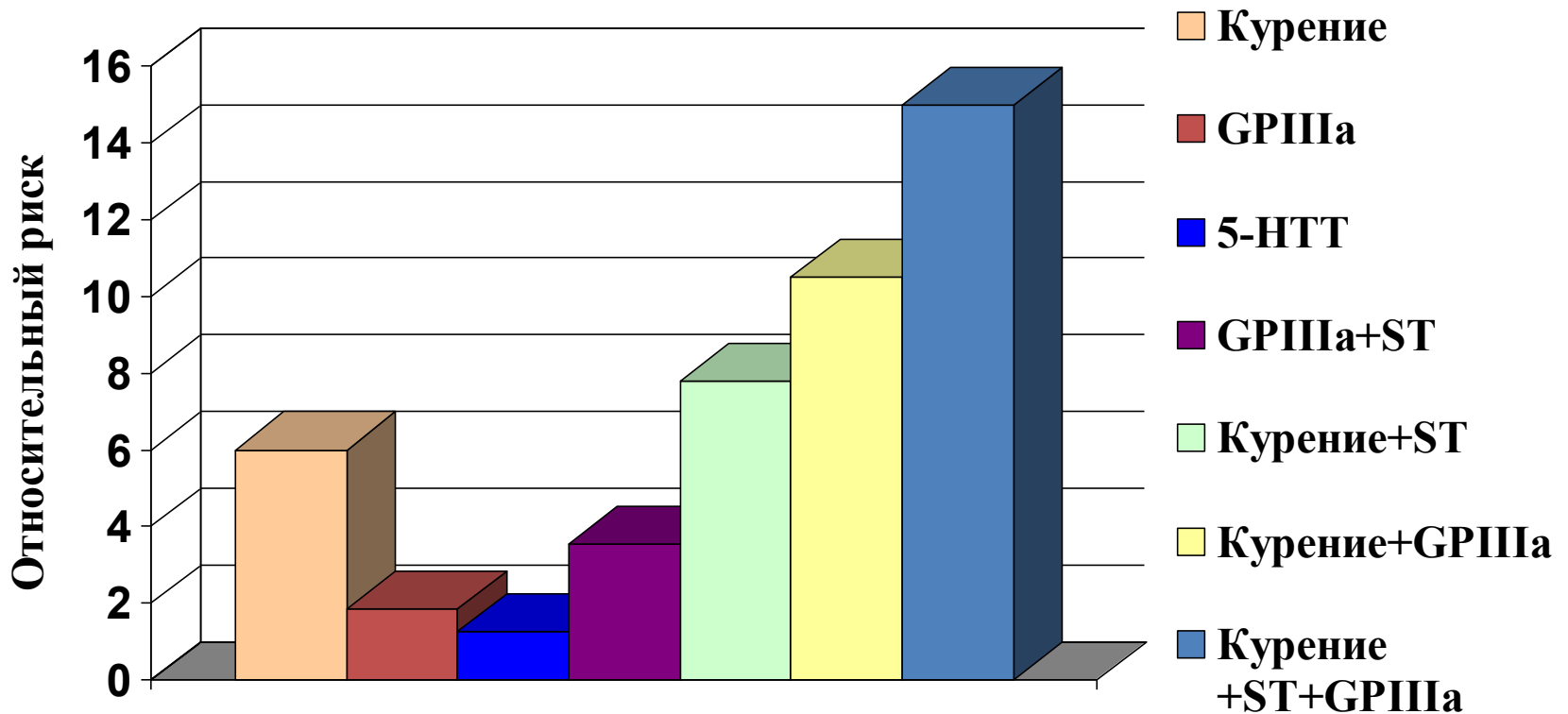
ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Наибольший прогресс в применении подходов ПМ наблюдается в диагностике и лечении мультифакторных заболеваний: онкологии, кардиологии, эндокринологии, лабораторной медицине, гинекологии, ревматологии, других областях медицины, а также фармакологии (фармакогенетика, фармакогеномика), выявление лекарственной резистентности, разработке и клинических испытаниях лекарственных средств. В организационных аспектах это ранняя диагностика, оценка риска, профилактика, мониторинг лечения.

Генные сети по отношению к функциональным генным кластерам



Кооперативный эффект генетических и средовых факторов, определяющих риск развития инфаркта миокарда у мужчин в возрасте до 45 лет



ЗАДАЧИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ:

- **Выявление подтипов, ранее казавшихся едиными, заболеваний**
- **Нахождение на этой основе мишеней для создания новых лекарственных средств**
- **Фармакогенетическая оценка эффективности существующих и вновь создаваемых лекарственных средств**
- **Создание на основе ОМИКСных технологий для выявления заболеваний высокоспецифичных диагностических панелей лабораторных биомаркеров**

Главным фактором, запустившим взрывной рост медицинской генетики, стала потребность в развитии персонализированной и превентивной медицины. Считается, что до 20% существующих медицинских протоколов лечения неэффективны, поскольку не учитывают индивидуальные особенности организма человека, а также не учитывают изменения эпидемиологической обстановки в мире (множественная лекарственная устойчивость патогенов, чрезвычайная вариабельность микроорганизмов).¹

¹<https://www.healthcarebusinessinternational.com/fraud-analytics-set-to-reshape-private-healthcare/>

В Nature Medicine опубликована статья, в которой крупные мировые стратеги здравоохранения задались вопросом определения главных ресурсов здравоохранения с точки зрения эффективности работы.

Проведено специальное исследование: к тысяче пациентов с определенной патологией применили современное стандартное лечение, некий средний уровень возможный на сегодня терапии, и эффективность оказалась **30%. К другой тысяче больных применили подходы ПМ и эффективность составила до **70%**.**

Таким образом, уже сегодня, опираясь на современные лекарственные и инструментальные ресурсы, эффективность лечения можно повысить на 40%!



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ

Deciphering Complex Disease

A systems biology approach using the SOLiD™ System

Detect and
Sequence
Insertions
and Deletions

Characterize
Copy Number and
Structural Variation

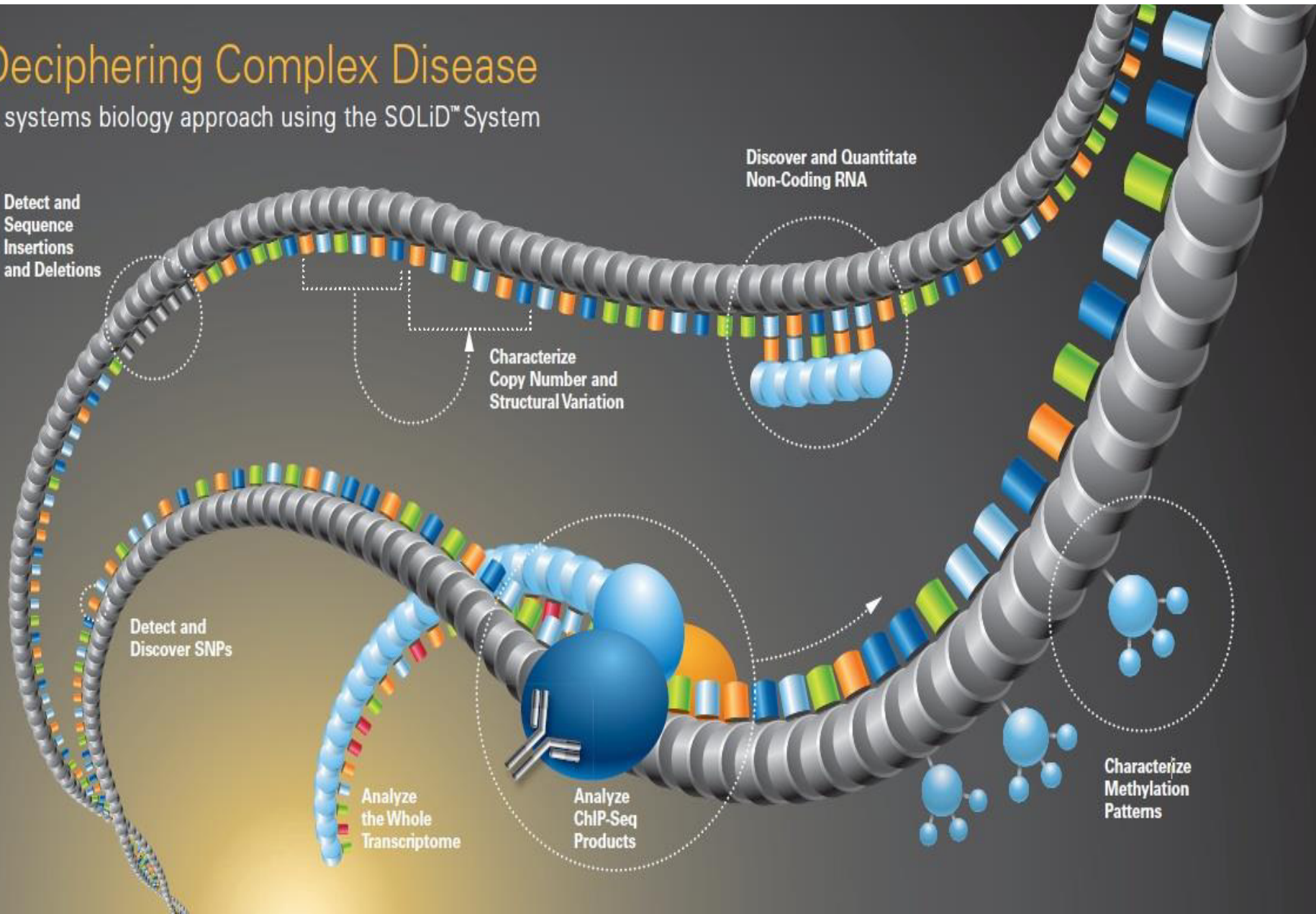
Discover and Quantitate
Non-Coding RNA

Detect and
Discover SNPs

Analyze
the Whole
Transcriptome

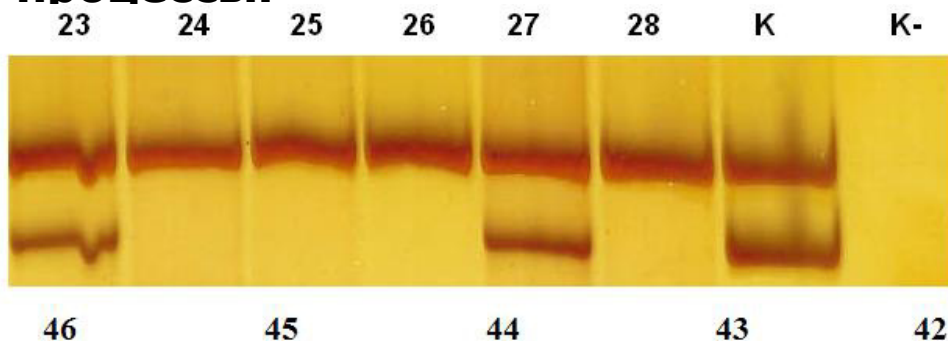
Analyze
ChIP-Seq
Products

Characterize
Methylation
Patterns

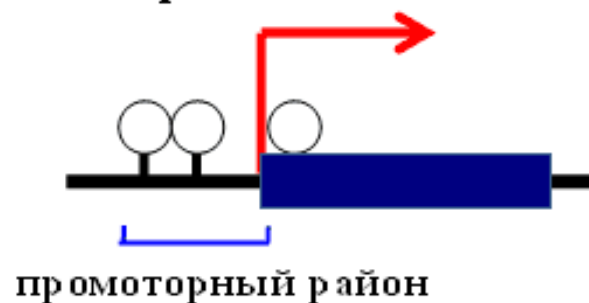


Аномальное метилирование – раннее событие канцерогенеза

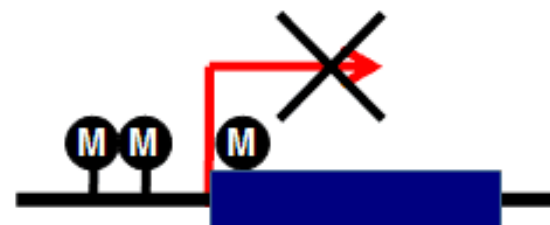
Аномальное метилирование - это метилирование промоторных районов генов супрессоров в опухоли, связанное с нарушением экспрессии и отсутствием белкового продукта, регулирующего клеточный цикл, клеточную дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и другие процессы.



Неметилированный ген



Аномальное метилирование гена

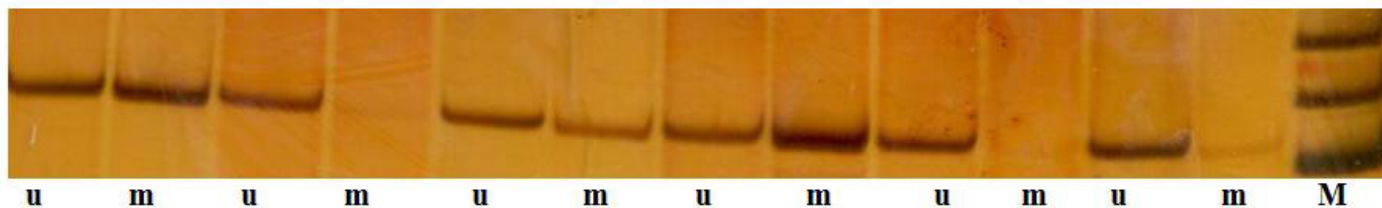


→ экспрессия

● M метилирование

○ отсутствие метилирования

41



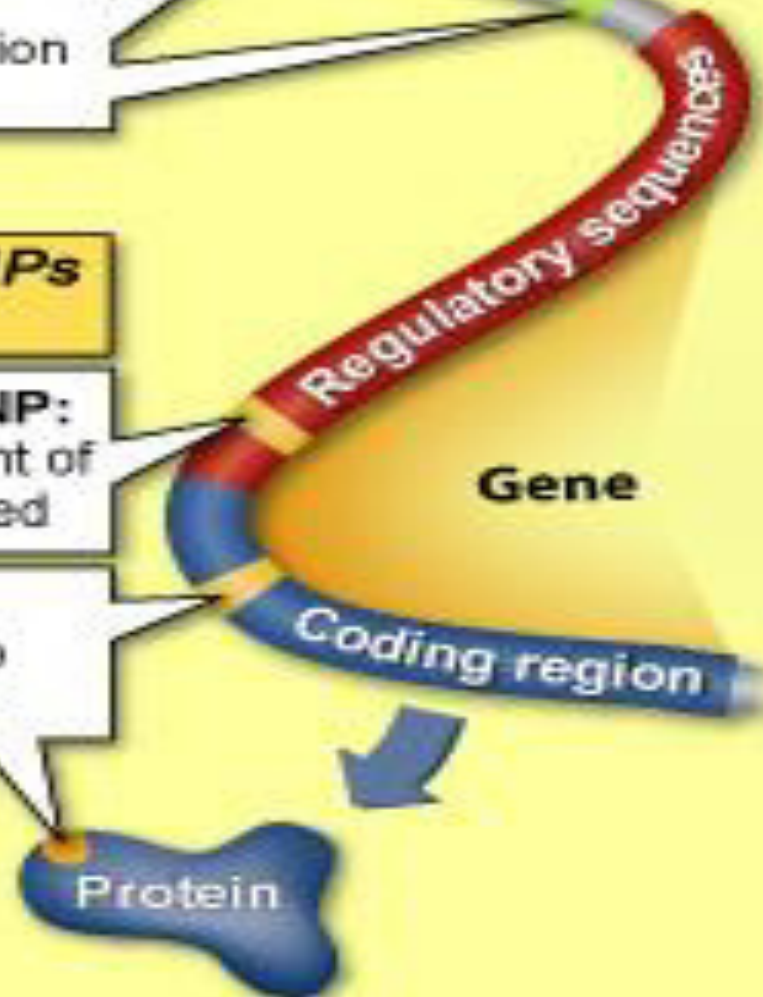
Linked SNPs
outside of gene

no effect on
protein production
or function

Causative SNPs
in gene

Non-coding SNP:
● changes amount of
protein produced

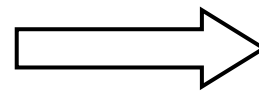
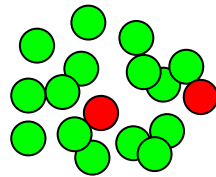
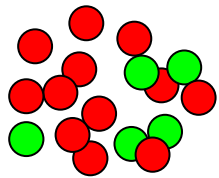
Coding SNP:
● changes amino
acid sequence



Выявление «генов предрасположенности» к заболеванию проводится путем сопоставлений частот генотипов у больных и здоровых

Группа больных

Контроль (здоровые)



● - генотип,
указывающий на
предрасположенность
к заболеванию.

$P_{\text{больные}}$

$>>$

$P_{\text{контроль}}$

OR – количественная мера предрасположенности (**O**dd **R**atio),
показывает во сколько раз повышена вероятность заболеть для
носителя «плохого» генотипа

$$\text{OR} = \frac{P_{\text{больные}} (1 - P_{\text{контроль}})}{P_{\text{контроль}} (1 - P_{\text{больные}})}$$

Распространенные аллели с большим эффектом, обнаруженные в GWAS (*по Ch.S. Ku, 2010*)

Болезнь	Наименование гена	rs	OR	OMIM	Регион
Возраст-зависимая дегенерация сетчатки	CFH	380390-C	4.60	134370	1q31
Эксфолиативная глаукома	LOXL1	382942-G	20.10	153456	15q24.1
Болезнь Крона	JL23R	10889677	2.13	607562	1p31.3
Рак яичка	KILTG	3782179	3.08	184745	12q22
		4474514	3.07		

Следующие признаки характеризуют генетический тест, который должен стать настоящим инструментом работы врача:

- включенные в панель генетические полиморфизмы должны соответствовать критериям ДМ (статистически достоверные, воспроизводимые, подвергнуты критической оценке в интересах пациента). ДНК тест имеет критерии достоверности, если полиморфизм и связанный с ним генетический риск обнаружен в ходе GWAS или выделен в результате проведенного мета-анализа. Важно, что количество участников исследований в группах для популяционной генетики должно быть не менее 1000 человек.



Исполнитель: Европейский консорциум Gabriel

Сотрудничество: 164 ученых из 19 стран (23 исследовательских групп)

Объекты исследования: 10 000 астматиков (дети и взрослые) и 16 000 здоровых индивидуумов.

Ключевые результаты проекта GABRIEL (2006-2010 г.г.)

Обнаружены новые гены, участвующие в иммунном ответе, проницаемости эпителия бронхов и контроле скорости восстановления повреждений слизистой оболочки дыхательных путей.

- **Астму ранее считали единой болезнью. Но полученные результаты предполагают биологические различия для трех клинических форм: детская, астма взрослых и тяжелая астма.**
- Аллергия является вторичным по отношению к дефектам слизистой оболочки дыхательных путей при астме и кожного барьера у детей с экземой. Терапия только аллергии не будет эффективна.
- Предсказательная ценность генетических тестов низкая. Необходима идентификация эпигенетических факторов.
- **Обозначены мишени для эффективной терапии астмы.**

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ОНП В БОЛЬШИНСТВЕ СЛУЧАЕВ ПЛОХО ПРЕДСКАЗЫВАЮТ РИСКИ БОЛЕЗНЕЙ

Ученые обнаружили исключения (например, болезнь Крона, целиакия и дегенерация желтого пятна), генетический вклад которых составляет приблизительно от 40% до 50%. В Университете Альберты проанализировали общедоступные данные 569 генетических исследований, собранных в течение двух десятилетий и охватывающих 219 медицинских состояний. В этих исследованиях изучались отношения между ОНП, и различными заболеваниями и состояниями. Подавляющее большинство заболеваний, включая многие виды рака, диабет и болезнь Альцгеймера, имеют в лучшем случае генетический вклад от 5 до 10%.

GWAS, позволяет существенно облегчить поиск генетических взаимосвязей и в этом плане превосходит метод, включающий только поиск ОНП.

Проведен GWAS для модели детской астмы, который выявил шесть новых генов, отвечающих за предрасположенность к этому заболеванию (MANEA, MRPL53, LYCAT, ST8SIA4, NDFIP1, и PTCH1), со средним уровнем ложноположительных результатов меньше 1%. Такой уровень достоверности является недостижимым для тестов, использующих только поиск ОНП, а влияние этих генов на заболевание преимущественно реализуется на транскрипционном уровне.

Интегративный полногеномный анализ ассоциаций (iGWAS)

Новый подход iGWAS, где используется информация об экспрессии генов для исследования взаимосвязи ОНП с фенотипом заболевания. В частности, **исследуется экспрессия генов, взаимоотношения внутри кластеров ОНП и само заболевание**, что позволяет разделить влияние генотипа на фенотип заболевания на две части.

Первая часть — это эффект, опосредуемый уровнем экспрессии генов, который называют медиаторным эффектом, вторая часть обусловлена влиянием других биологических механизмов или внешней среды и называется альтернативным эффектом.

Разработана глобальная система тестирования **обоих эффектов для создания простых моделей патогенеза заболеваний.**

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

В настоящее время в ПМ можно выделить несколько направлений ГТ: преимплантационное, пренатальное, неонатальное, педиатрическое и терапевтическое для взрослого населения. Обычно ГТ применяют в случаях наличия клинических симптомов или родственников, страдающих генетическим заболеванием.

Технологически ГТ осуществляется двумя методами, во-первых, таргетным секвенированием при наличии конкретных генетических полиморфизмов, и, во-вторых, полногеномного секвенирования. В первом случае исследуют конкретные генетические полиморфизмы: ОНП, CNV, вставки, делеции, дупликации и т.д. целевых генов или хромосомного региона. Полногеномные исследования применяют при заболеваниях с не совсем четкой клинической картиной, МФЗ, а также при проведении скрининговых исследований для выявления редких и не очевидных фенотипов

Идеальный метод генетического скрининга заболеваний должен иметь, по меньшей мере, три преимущества перед «традиционными» диагностическими тестами:

- результаты могут точнее говорить о риске развития заболевания, чем фенотипический и (или) биохимический скрининг;**
- должен существовать экономически оправданный и высокоэффективный способ предотвращения данного заболевания;**
- рекомендации, полученные в результате ГТ, должны исполняться пациентами беспрекословно.**

Основными и наиболее реальными направлениями использования технологий NGS в медицинской практике являются разные варианты ГТ и исследования микробиомного биоценоза человека.

Можно выделить два основных направления применения использованием геномного секвенирования в ближайшее время: **неинвазивный пренатальный скрининг (оценивается **100000 исследований в год в РФ**) и **онкология**: определение герминальных мутаций у здорового пациента для оценки риска возникновения рака (прежде всего РМЖ, рака легких, прямой кишки и др.) и соматических мутаций для подбора оптимальной терапии опухоли.**

Обычно ГТ применяют в случаях наличия клинических симптомов или родственников, страдающих генетическим заболеванием.

Schiabor Barrett, et al. Positive predictive value highlights four novel candidates for actionable genetic screening from analysis of 220,000 clinicogenomic records. // Genetics in Medicine (2021). DOI: [10.1038/s41436-021-01293-9](https://doi.org/10.1038/s41436-021-01293-9)

В США уже проводят генетический скрининг населения, направленный на выявление рака груди и яичников, связанного с мутациями *BRCA1* и *BRCA2* и вариантов *LDLR* с коронарным атеросклерозом. Скрининг заболеваний необходим, так как они достаточно распространены, риск сильно коррелирует с мутациями в определенных генах, а раннее выявление позволяет существенно облегчить лечение.

Показатель значимости генетического варианта при скрининге — положительная прогностическая ценность (positive predictive value, PPV) — вероятность, что человек с обнаруженным «плохим» генетическим вариантом действительно окажется болен.

Исследователи из американской компании Helix, которая занимается популяционной геномикой, проанализировали экзомы и медицинские карты более 220 000 пациентов, что позволило выявить несколько новых редких генетических состояний, с высокой PPV указывающих на заболевания и могут быть включены в программы генетического скрининга населения. Всего было обнаружено 74 статистически значимых ассоциации между 27 генами. Генетических состояний с PPV более 0,3 (не менее чем у 30% людей с этим вариантом гена разовьется болезнь) оказалось всего семь. Среди них четыре ранее не описанных варианта генов: была показана связь варианта *GSK* с сахарным диабетом, варианта *HBB* с гемоглобинопатией, варианта *PKD1* с поликистозной болезнью почек и варианта *MIP* с катарактой.

Форматы клинических исследований с использованием геномного секвенирования (NGS):

полногеномное секвенирование (whole genome sequencing, WGS);
полноэкзомное секвенирование (whole exome sequencing, WES);
секвенирование генных панелей.

Полногеномное секвенирование для 50-кратного прочтения необходимо получить 170 млрд. букв. Используется в клинике как альтернатива микрочиповой диагностике или полногеномной гибридизации для поиска крупных структурных изменений хромосом (более 100000 п.н.). Хорошо подходит для неинвазивного скрининга. К WGS прибегают, когда остальные методы генодиагностики себя исчерпали.

Полноэкзомное секвенирование наиболее перспективный метод анализа, если генетическая природа заболевания не ясна. Результаты WES кагорт пациентов, подобранных по нозологиям, обобщены в хорошо клинически аннотированные БД и позволят выявлять новые генетические компоненты моногенных и МФЗ.

Секвенирование генных панелей позволяет исследовать сразу все гены, мутации в которых вызывают клинически сходные поражения. В настоящее время данный формат является наиболее распространенным из-за простоты, дешевизны и относительно простой интерпретации данных. В панель включают только те гены, для которых уже доказана связь с заболеваниями.

В настоящее время в различных лабораториях мира предлагают более 1000 генетических тестов, в том числе компании, которые предлагают их пройти, минуя врача, однако точность значения и целесообразность ряда тестов для медицины иногда вызывают сомнения. Развитие рынка ГТ зависит не только от возможностей науки, но и от запросов общества.

Особенности метода: охват

Некоторым пациентам молекулярный диагноз не может быть поставлен другим способом.

Причины:

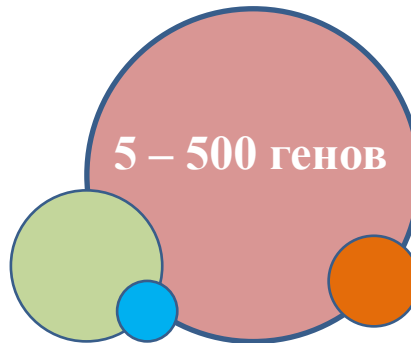
- генетическая гетерогенность
- отсутствие четкой клинической гипотезы

1 ген



Секвенирование
по Сэнгеру

5 – 500 генов



Генные панели

Полный экзом:
20 000 генов

Клинический
экзом: 4800 генов

Экзом

Требования к точности клинического диагноза

Работа с генетическими панелями – это новое направление мышления в системе работы врача,
учитывающее его уровень компетенций,
практический опыт, основываясь на
индивидуальности пациента. Врач должен уметь
интерпретировать результаты теста, самостоятельно
составлять заключение и персональные
рекомендации пациенту. В этом и состоит суть
персонализированного подхода. Система принятия
решений (ИИ) может появиться в будущем на стыке
генетики и биоинформатики, а пока принятие
решений по генетическому тестированию пациента
находится в зоне ответственности его лечащего врача.

Наиболее распространенные проблемы у современных продуктов генетических исследований:

- генетическая панель исследует мало генетических точек и на этой основе формулируются только общеизвестные рекомендации. Другой крайностью является то, что генетическая панель включает много генетических точек, например, 500 тыс., что сложно интерпретировать и неудобно для врача-практика

-гены, отвечающие за функции высшей нервной деятельности человека, недостаточно исследованы, а в генетической практике психиатрических заболеваний нет репрезентативных выборок в связи со спецификой пациентов, совершенно бесполезны в практике врача и дискредитируют реальные научные наработки.

Почему экзом

Стоимость секвенирования полного генома в **~4 раза выше** секвенирования экзома.

Стоимость хранения и анализа данных выше **в ~10 раз**.

Для анализа здоровых:

99% описанных вариантов можно обнаружить с использованием секвенирования экзома.

При анализе генома обнаруживается большое количество перестроек с **неясной значимостью**.

Не описанные варианты в некодирующих последовательностях для пациентов без фенотипа невозможно интерпретировать.

**Количество подтвержденных молекулярных диагнозов
повышается при повторном анализе экзомов пациентов,
секвенированных 6 лет назад.**

Повторный анализ данных 250 экзомов, (первый в 2012 г.) и на основе знаний на декабрь 2017 г., увеличил молекулярно-диагностический выход подтвержденных случаев с 25 до 47%. Новые молекулярные диагнозы были вызваны как открытием новых генов, ассоциированных с заболеваниями, так и применением улучшенной классификации вариантов в генах известных болезней, а также выявлением патогенных вариантов числа копий некоторых участков экзома. Около **трех четвертей пациентов после пересмотра их генетических данных были направлены на дополнительное генетическое консультирование, тактика ведения 17 из них была кардинально пересмотрена.**

Pengfei Liu et al. // Reanalysis of Clinical Exome Sequencing Data // N Engl J Med 2019; 380:2478-2480.

Результаты проект 100 000 Genomes свидетельствуют о диагностической значимости полногеномного секвенирования по сравнению с экзомным для редких заболеваний

Проанализировали данные 4 660 пациентов из 2 183 семей и найлены новые локусы, ассоциированные с зарегистрированными 161 редкими расстройствами: неврологические, офтальмологические и опухолевые синдромов. 13% всех диагнозов, были связаны с мутациями в некодирующих областях или митохондриальных генах, экспансией tandemных повторов и структурными вариантами, что говорит о преимуществе полногеномного секвенирования по сравнению с секвенированием экзома. Для 134 из 533 пациентов с установленным ранее генетическим диагнозом лечение было изменено.

В некодирующих участках генома есть много областей, определяющих специфичную для разных клеток работу генов.

Известно о 80 тысячах таких некодирующих НП, а по оценкам, их число может достигать нескольких сотен тысяч. Современное развитие технологий и тонкого анализа экспрессии генов открывает новый горизонт: станет ясно, что практически весь наш геном активно работает и все его участки имеют определенную функцию, что резко повысит понимание, почему определенные мутации связаны с определенными заболеваниями.

Недавно удалось выявить генетический маркер по экспрессии гена, и можно прямо во время операции по удалению первичной опухоли рака эндометрия предсказать, будут ли у пациентки метастазы. Врач во время операции может принять решение о том, оставлять или не оставлять лимфатические узлы, которые обычно удаляют в профилактических целях. Практика показывает, что в 80% случаев это удаление необоснованно, и такая перестраховка снижает качество жизни у 80% женщин

РУССКИЕ ГЕНОМЫ

Национальные геномные проекты стали уже обычным явлением в разных странах, и с каждым годом их число увеличивается. В 2015 году в Санкт-Петербурге стартовал проект «Российские геномы». В исследовательский консорциум вошли геномные лаборатории из разных городов страны: Москвы, Новосибирска, Томска, Уфы, Хабаровска и др. Координирует проект Центр геномной биоинформатики им. Ф. Г. Добржанского Санкт-Петербургского государственного университета. Итогом работы исследователей и волонтеров (предоставляющих свой биоматериал) должна стать открытая компьютерная база анонимных геномных данных более 3000 человек из разных регионов России. Предполагается описать геномные вариации и создать информационную базу вариаций, значимых для медицины

Проведение ГТ будет способствовать реклассификации заболеваний на молекулярной основе

ГТ даст возможность использовать одно ЛС для лечения нескольких заболеваний. Многие МФЗ представляют собой совокупность различных состояний, каждое из которых имеет собственную молекулярную природу. Например, два лейкоза могут быть идентичными морфологически, но иметь разные молекулярные профили и по-разному реагировать на ЛС.

Европейский опыт показывает, что «фармакологический паспорт» включающий 58 генетических вариантов 14 генов (CYP2B6, CYP2C3, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5, DPYD, F5, HLA-A, HLA-B, NUDT15, SLCO1B1, TPMT, UGT1A1, VKORC1) может быть использован вместе с клиническими рекомендациями для оптимизации дозы и прогнозирования побочных эффектов для 49 часто применяющихся ЛС.

ПРЕЦИЗИОННАЯ МЕДИЦИНА

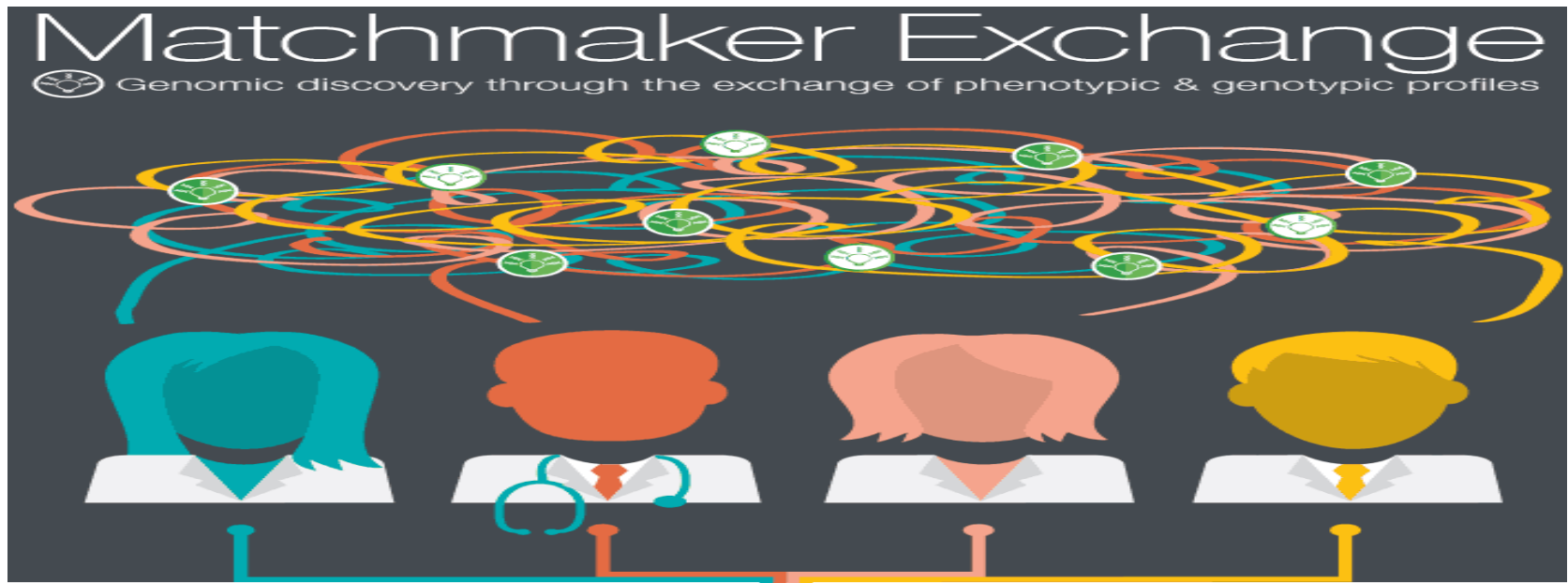


ИСТОРИЯ ПОЯВЛЕНИЕ ТЕРМИНА ПРЕЦИЗИОННАЯ МЕДИЦИНА

В книге экономистов К. Кристенсена и Дж. Гроссмана «Инновационное предсказание», вышедшей в 2009 г. впервые появляется сам термин прецизионная медицина. Это событие произошло после случая с мальчиком Ником Волкером, у которого в 2 года сильно болел кишечник, а к 6 - он перенёс 160 операций. К лечению мальчика подключился Ховард Джейкоб, секвенировавший его геном и нашедший мутацию в гене XIAP, ответственную за редкий воспалительный процесс в кишечнике, который лечится трансплантацией костного мозга.

Ной – 6-летний мальчик, который страдает заболеванием, названия для которого просто нет.

В январе **2015** г. программисты из Торонто начали тестировать систему (MatchMaker Exchange) по обмену генетической информацией между больницами и другими медицинскими организациями и пока ее главная цель – налаживание взаимодействия между медиками различных стран, которые занимаются проблемой редких генетических мутаций в одном-единственном гене.



ОБЩЕЕ И РАЗЛИЧИЕ В ПОДХОДАХ ПМ И ПрМ

ОБЩЕЕ:

ОМИКсные технологии (ПМ, ПрМ)

Таргетные лекарственные препараты (ПМ, ПрМ)

Влияние факторов окружающей среды (ПМ, ПрМ)

ПРЕЦИЗИОННАЯ МЕДИЦИНА

Электронная медицина (мед. карты, анкеты)

Цифровая медицина (ИИ, БД, «аватары»)

Мобильное здравоохранение (24/7, телем.)

Предиктивная медицина
- диагностическая медицина
ранних лабораторных
биомаркеров и генетических
предрасположенностей
(оценка вероятностей)

ИННОВАЦИИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

1890 г. ГРАВИМЕТРИЯ

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

ТИТРОМЕТРИЯ

ФОТОМЕТРИЯ

ММОЛЬ/Л

НЕФЕЛОМЕТРИЯ

1940 г. ХРОМАТОГРАФИЯ

ФЛЮОРОМЕТРИЯ

МКМОЛЬ/Л

АТОМНАЯ АБСОРБЦИЯ

1960 г. РАДИОИММУНОАНАЛИЗ

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

НМОЛЬ/Л

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

1980 г. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

ПМОЛЬ/Л

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

МИКРОБИОЧИПЫ

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

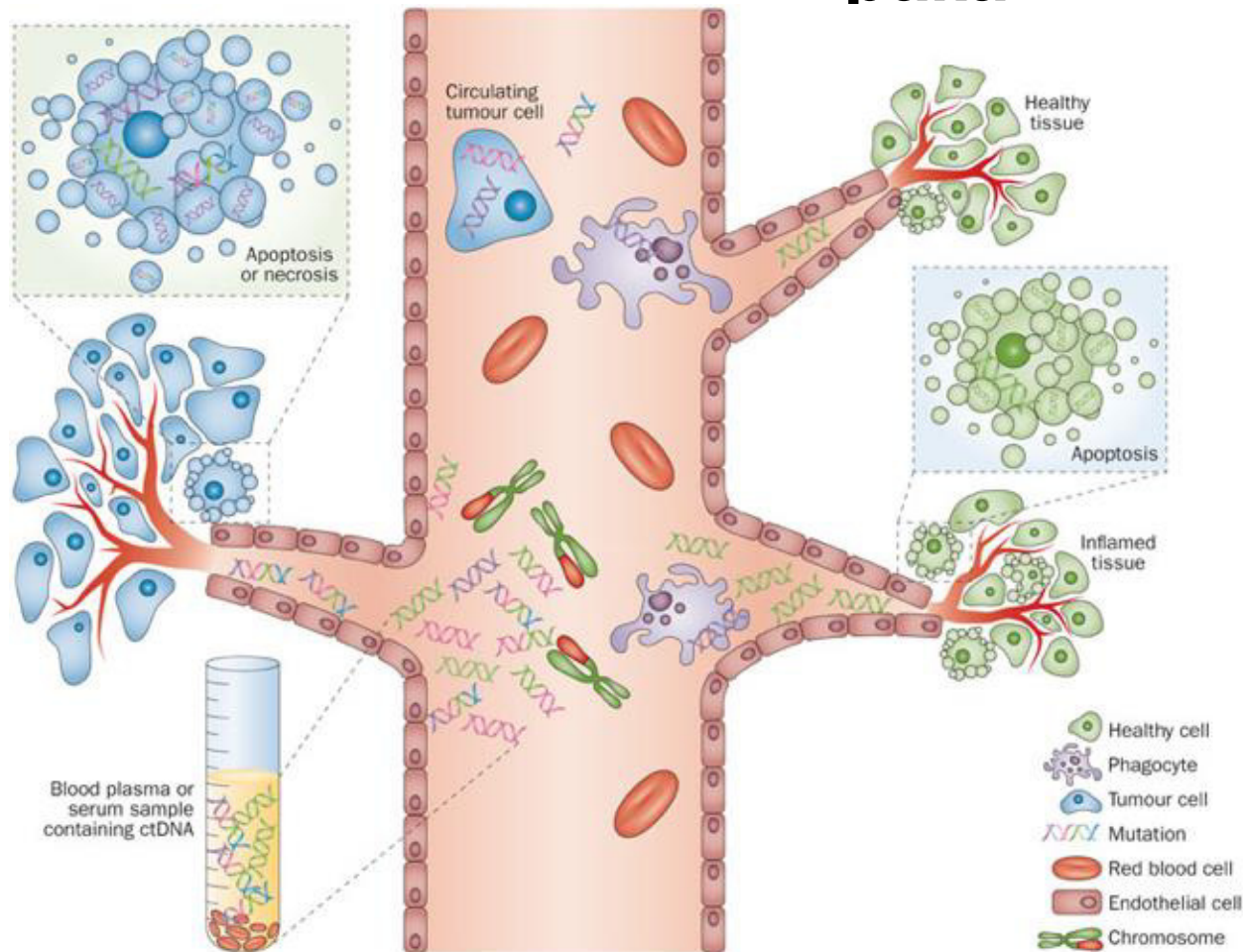
цПЦР-высокая точность и чувствительность

Метод	Чувствительность	Оптимальная область применения
Капиллярное секвенирование	Больше 10%	Опухолевая ткань
Пиросеквенирование	10%	Опухолевая ткань
NGS	2%	Опухолевая ткань
Количественная ПЦР	1%	Опухолевая ткань
Аллель специфическая ПЦР (ARMS)	0,10%	Опухолевая ткань
Цифровая ПЦР	0,1% и ниже	цДНК, редкие варианты

ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ

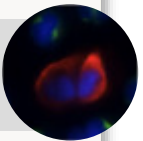
**ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (ЦОК,СТС)**

Мишени для периферийного мониторинга рака

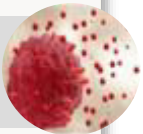


2 главные
ДНК-мишени:
ЦОК и вкДНК

- Циркулирующие
Опухолевые Клетки
(ЦОК)



- Экзосомы

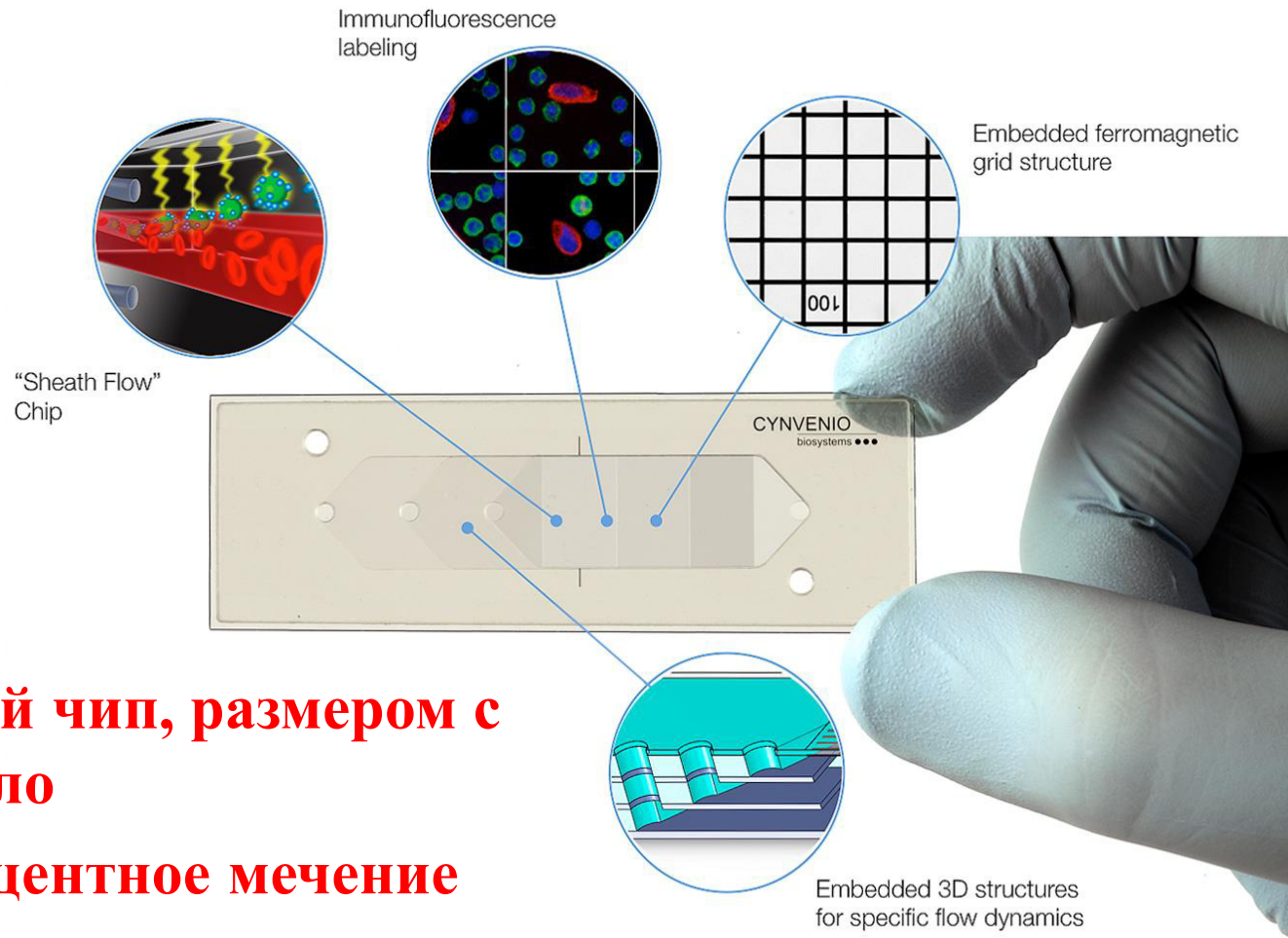


- Внеклеточная ДНК
(вкДНК)



Циркулирующие опухолевые клетки, внеклеточная и герминальная ДНК из единого образца крови

В основе –
специальный
проточный чип



- Микрофлюидный чип, размером с предметное стекло
- Иммунофлуоресцентное мечение
- Встроенная ферромагнитная сетка позволяет проводить подсчет и анализ клеток

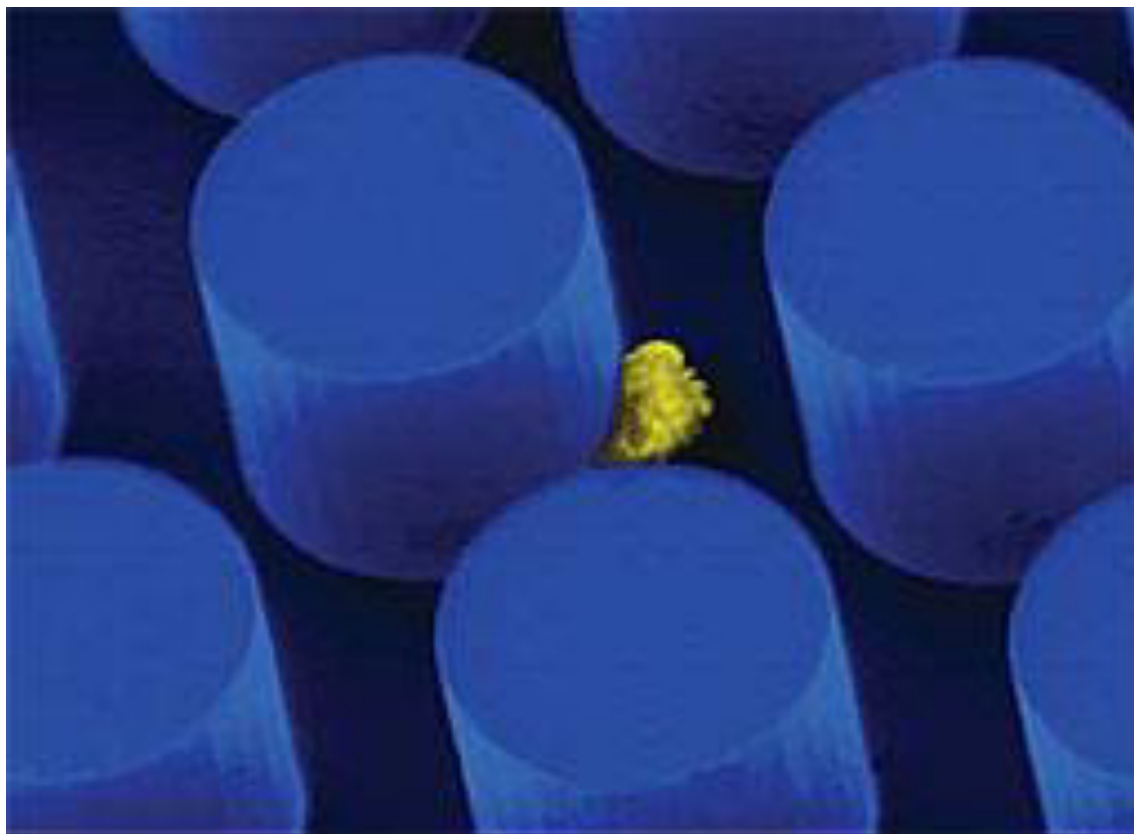
СТС - МИКРОБИОЧИП

состоит из кремниевого чипа с присоединенными к нему колонками, камеры, и пневматического насоса. Колонки покрыты антителами к адгезивным молекулам эпителиальных клеток (EpcAM, epithelial cell adhesion molecule) которые играют роль миниатюрных пробирок где смешиваются клетки и химические вещества. СТС-чип содержит **78 тыс. колонок**, выхватывающих раковые клетки. В отличие от обычных клеток почти все клетки карцином несут на поверхности EpcAM.

Обнаруживает одну ЦОК крови даже среди миллиарда нормальных, в 100 раз превосходя по чувствительности наиболее распространенные методы идентификации аномальных клеток.

Раковая клетка легких "прилипла" к микроколонке *СТС*-чипа, которая покрыта антителами.

Размеры каждой колонки - 100 x 100 мкм



Сиквенс одной клетки

ВОЗМОЖНОСТЬ СИКВЕНСА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОК ОТКРЫВАЕТ НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ.

(Battlich N. et al. Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution.// Nat. Methods. – 2013. – 10. – P. 1127-1133.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ ПО СРАВНЕНИЮ С НОРМАЛЬНОЙ, ОТ ПАЦИЕНТА К ПАЦИЕНТУ. DE NOVO МУТАЦИИ, НАБЛЮДАЕМЫЕ В СПЕРМЕ С ВОЗРАСТОМ, АССОЦИИРУЮТСЯ С АУТИЗМОМ, ШИЗОФРЕНИЕЙ, И УМСТВЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ.

(Boycott K.M. et al Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation.// Nat. Rev. Genet. – 2013. – 14. – P. 681-691.)

Клинический случай: 52-летняя больная с НМРЛ

Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F

Shaw A.T., Friboulet L., Leshchiner I, et al.//N Engl J Med 2016; 374, P 54-61

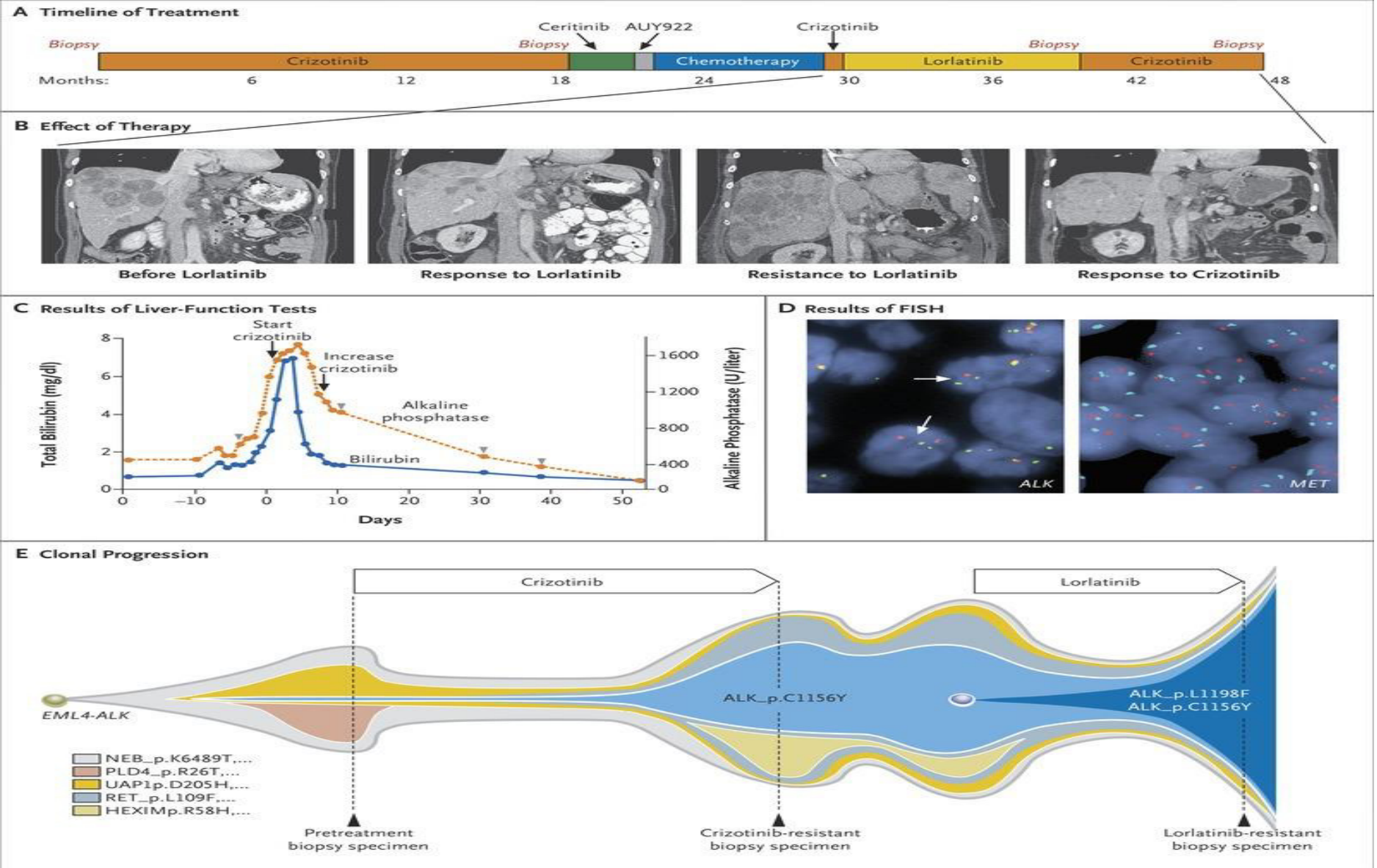
После молекулярно-генетического исследования был назначен «таргетный препарат» Кризотиниб (К).

Через 18 месяцев в клетках опухоли появилась новая мутация и клетки стали устойчивы к препарату. Повели химиотерапию, которая заставила опухоль отступить на полгода. Затем снова рецидив и была попытка снова применить **К** – безуспешно.

Затем появился проходивший клинические испытания новый препарат – Лорлатиниб и болезнь отступила на 6 месяцев.

Затем снова тяжелый рецидив с утратой функции печени.

Снова молекулярно-генетический анализ, продемонстрировавший появление новой мутации, восстановившей чувствительность к **К**, который был назначен в третий раз! Метастазы сократились в объеме и восстановилась функции печени. Больная прожила еще полгода.



Биопсия (Б)

1 мутация

Б 2 мутация

Б 3 и 4

Кризотиниб (К)

ХТ - К - Лорпатиниб

К

18 мес.

Традиционная биопсия ткани и «жидкая биопсия»

Образец твердой опухоли

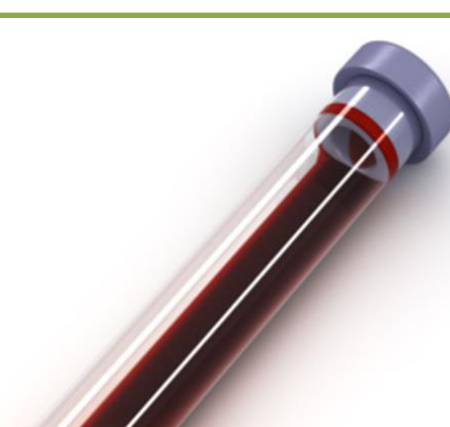


Трудности

- Инвазивная процедура
- Ограниченное количество подходов
- Ограниченное кол-во материала
- Опухоль может быть недоступна для биопсии
- Не дает информации о гетерогенности опухоли



Жидкая биопсия



Преимущества

- Неинвазивный метод – забор образцов может быть многократным в разные моменты времени
- Менее дорогой и более быстрый
- Больше информации о гетерогенности опухоли
- Мониторинг резистентности и эффективности лечения

ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА СВОБОДНОЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК

**НЕИНВАЗИВНОЕ ПРЕНАТАЛЬНОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ (НИПТ)**

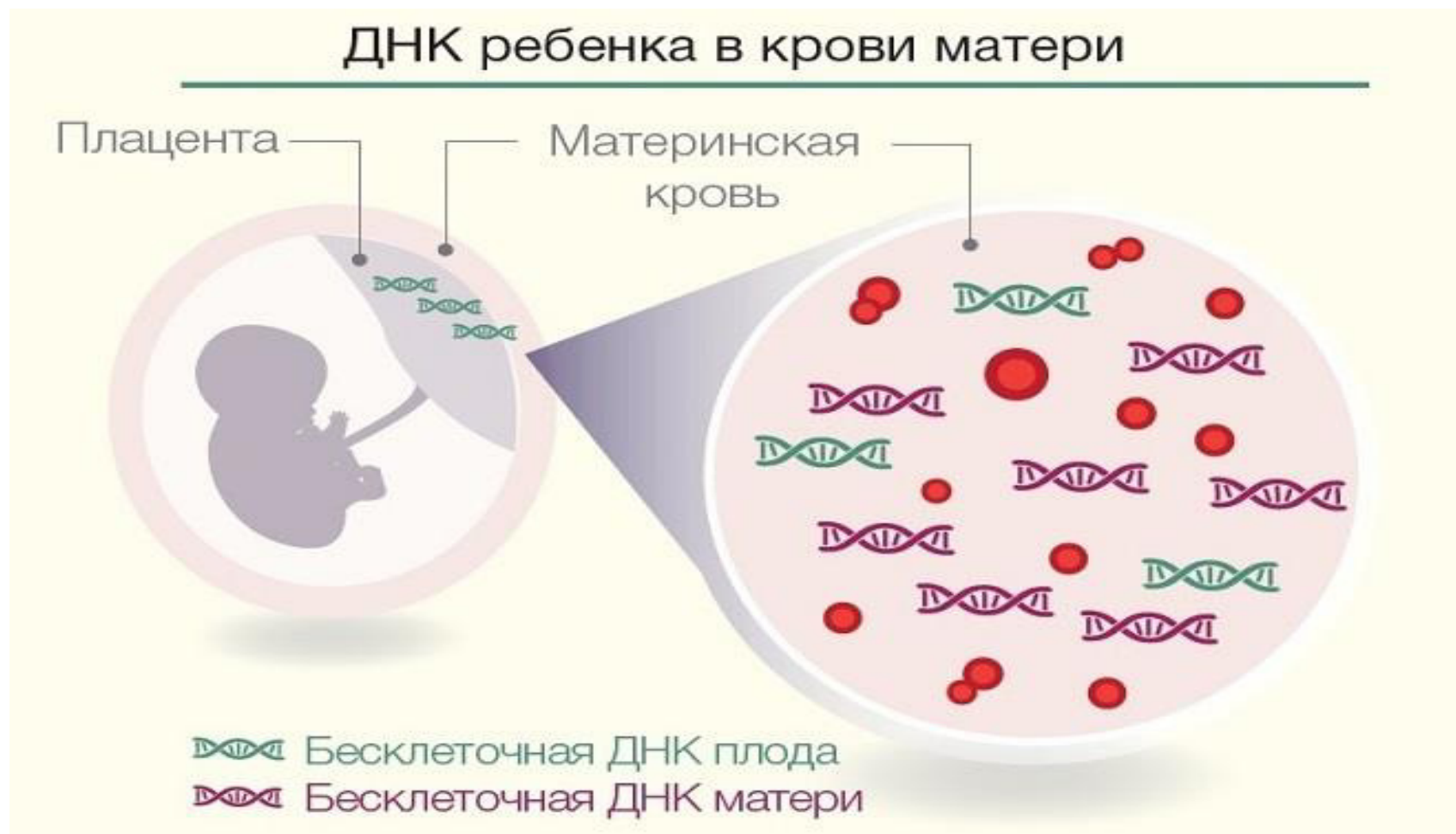
**АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПРИ
РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ)

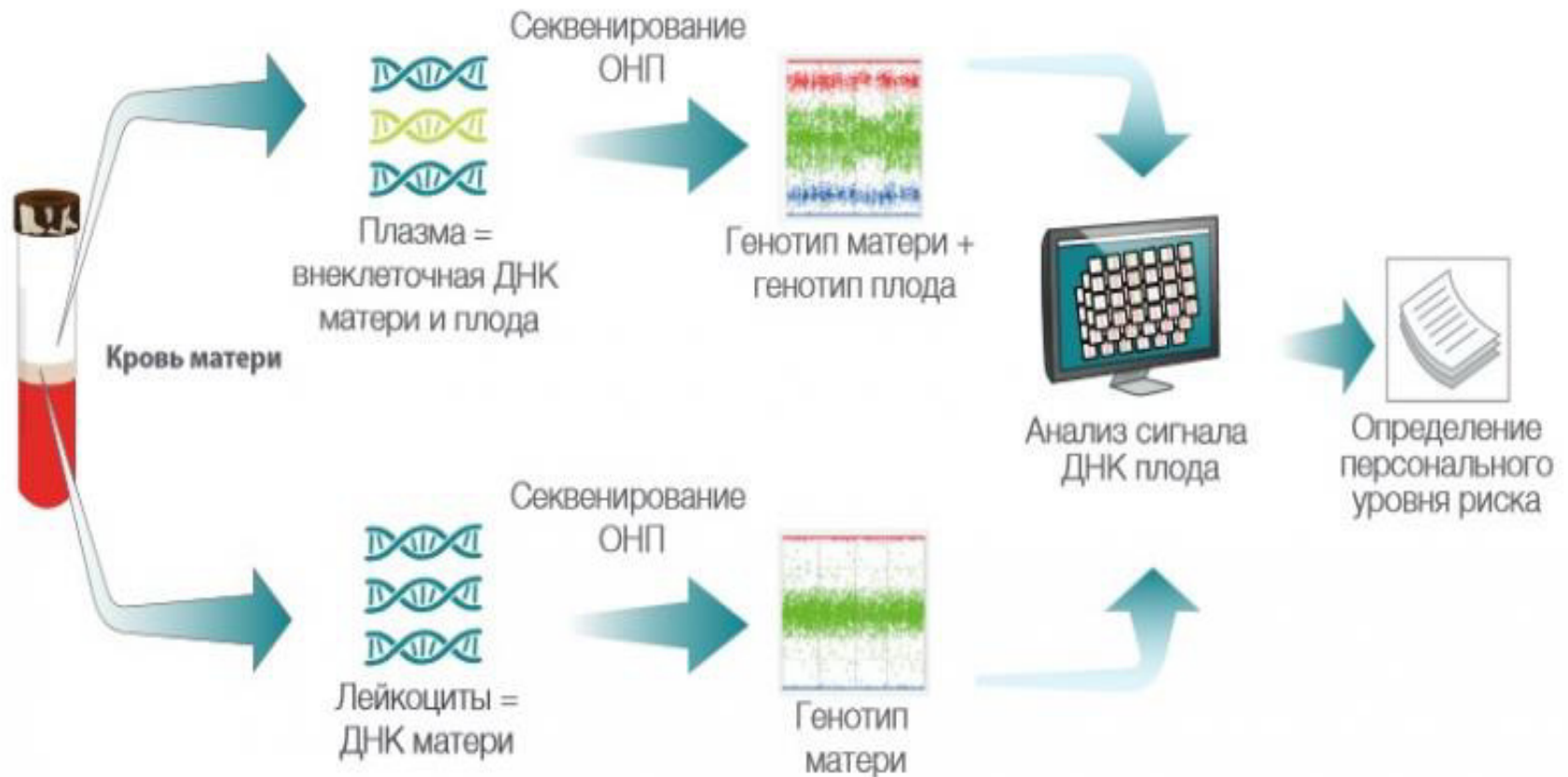
**Использование в ГТ циркулирующей в кровотоке матери
внеклеточной ДНК плода (self-free fetal DNA, cffDNA)**

Весьма перспективной технологией пренатального ГТ является использование циркулирующей в кровотоке матери внеклеточной ДНК плода, начиная уже с пятой недели беременности. По числу прочтений, которые относятся к исследуемой хромосоме относительно референсной, можно определить случаи анеуплодии, выявить пол будущего ребенка, хромосомные перестройки. Указанный метод в 2012 г. одобрен как дополнение к существующим протоколам в США, но назначается либо при высоком риске наследственных заболеваний, или по желанию. NGS секвенирования всей внеклеточной ДНК и матери и плода, то это дает возможность диагностировать любое наследственное заболевание.

НАЧИНАЯ С 5 НЕДЕЛИ БЕРЕМЕННОСТИ ПРОВОДИТСЯ ЗАБОР 18 МЛ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ



Количественный, когда просто сравнивают количество исследуемых хромосом (13, 18, 21 и половых) относительно шестой и определяют вероятность наличия синдромов Дауна, Эдвардса, Патау, Клайнфельтера и Тернера.



Опыт неонатального скрининга в мире

Проект	Кол-во генов	Кол-во исследованных здоровых	Итоги
Nexus 2016-2019	466	61 + 45 с заболеванием	Чувствительность скрининга с помощью NGS ниже, чем ТМС, но возможны дополнительные находки.
Babyseq 2015-2020	954	127	У 11 (8.6%) были обнаружены патогенные и вероятно патогенные находки, 6 из которых были ассоциированы с риском развития кардиомиопатии; 4 (3%) в гене TTN.
Проект в Китае (PMC8862216, <i>ретроспективный</i>)	134 (только AR)	4950 + 36 с заболеванием	По данным генетического скрининга у 4 новорождённых с отрицательным результатом биохимического скрининга было подтверждено наличие моногенных заболеваний.
Newborn genomes program (UK) 2023-2025	200	100-200 тысяч	Проект начнётся в 2023 году, планируют секвенировать 100 тысяч новорождённых за 2 года.
GUARDIAN (New York) 2022-2026	160 + 100	Более 100 тысяч	Планируют анализировать 160 генов, для вариантов в которых есть профилактика или лечение и при желании родителей 100 генов, для вариантов в которых нет лечения.

Пилотный проект ЭКЗАМЕН

**(«Экзомный Клинически Значимый Анализ Мутаций
Единичных Нуклеотидов»).**

В Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии перинатологии имени академика В.И. Кулакова провели в 2022-2023 гг. полноэкзомный скрининг всех новорожденных, родители которых дали на это согласие.

Итог: 245 находки у 8413 новорождённых (~3%) и только 8 входят в расширенный скрининг на 36 заболеваний

ИТОГИ ПРОЕКТА

(данные Д.Ю. Трофимова)

Тип варианта	Количество находок у «здоровых» (N=7830)	Количество находок у пациентов с врожденными и перинатальными заболеваниями (N=583)
Мутации в экзонах	103 (1,3%)	77 (13%)
Хромосомные нарушения	20 (0,25%)	45 (7,7%)
Всего:	123 (1,5%)	122* (21%)

** ещё у 124 (21%) пациентов обнаружены варианты неясной значимости (VUS)*

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

