

Познавательный журнал для хороших людей

НАУКА

из первых рук

www.scfh.ru

4 4⁽⁷⁵⁾ ● 2017

НАУКА ИЗ ПЕРВЫХ РУК

№ 4 (75) 2017

БИОТЕХНОЛОГИИ -
МЕДИЦИНЕ
БУДУЩЕГО

КАК ПИСАТЬ
И ПЕРЕПИСЫВАТЬ
ПАРТИТУРУ ДНК

КЛЕТОЧНАЯ
ЭКЗОТИКА
В РОССИИ

«ТОЧНАЯ»
ОНКОЛОГИЯ
ПРОТИВ «СЛАБЫХ»
МЕСТ ОПУХОЛИ

Россия Делает Сама



Прошло 50 лет с тех пор, как сибирские химики опубликовали первую в мире работу по ген-направленным соединениям. Эта публикация 1967 г. стала началом принципиально нового и в наши дни бурно развивающегося направления молекулярной биологии и фармакологии.

На архивной фотографии 1964 г. — молодые сотрудники недавно созданной лаборатории природных полимеров новосибирского Института органической химии СО АН СССР, где была впервые реализована идея направленного воздействия на ДНК.

Н. И. Гринева (в первом ряду крайняя слева) и Д. Г. Кнорре (в первом ряду в центре) на основе принципа молекулярного узнавания, используемого самой природой, сформулировали идею направленного воздействия на гены с помощью олигонуклеотидов — фрагментов нуклеиновых кислот, «вооруженных» специальными химическими группами.

Ко времени появления этого необычного по смелости проекта прошло немногим более десяти лет с открытия структуры ДНК, эффективных методик секвенирования последовательностей нуклеиновых кислот не существовало и даже синтезировать их еще только учились... Добиться успеха новосибирским химикам удалось благодаря уникальным возможностям, которые существовали в Сибирском отделении АН СССР, одним из основных принципов которого с самого начала была междисциплинарность

На первой странице обложки:

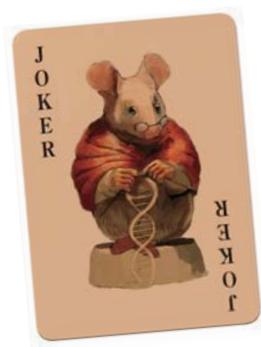
В композиции обложки использована модификация изображения https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kashira_dark_house_window_06.jpg по лицензии Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)

4. 2017
научно-популярный журнал



НАУКА

из первых рук



В НОМЕРЕ:

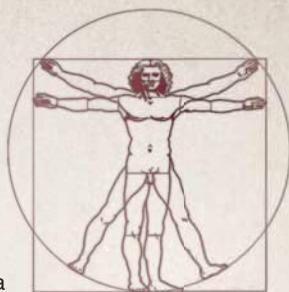
Клеточные линии человека, которые научились получать из клеток кожи или крови путем перепрограммирования и геномного редактирования, могут заменить лабораторных животных в испытаниях новых лекарств

Тысячи молекул-зондов в «нанопробирках», из которых состоит матрица биочипа, позволяют одновременно проводить множество анализов буквально одной капли крови

С помощью прибора в виде браслета-датчика с микроиглочками в ближайшем будущем можно будет измерить уровень стресса человека по содержанию окисленной ДНК

Даже у одного и того же больного раковая опухоль со временем «эволюционирует», меняя устойчивость к тому или иному виду терапии, поэтому в молекулярно-генетической диагностике больше всего нуждаются пациенты с метастазами и рецидивами

Познавательный журнал
для хороших людей



Редакционная коллегия

главный редактор
акад. *Н. Л. Добрецов*
заместитель главного редактора
акад. *В. И. Бухтияров*
заместитель главного редактора
акад. *В. В. Власов*
заместитель главного редактора
чл.-корр. *Н. В. Полосьмак*
заместитель главного редактора
акад. *В. Ф. Шабанов*
ответственный секретарь
Л. М. Панфилова
акад. *И. В. Бычков*
акад. *М. А. Грачев*
акад. *А. П. Деревянко*
акад. *А. В. Латышев*
к. ф.-м. н. *Н. Г. Никулин*
акад. *В. Н. Пармон*
акад. *Н. П. Похиленко*
чл.-корр. *М. П. Федорук*
акад. *М. И. Эпов*

Редакционный совет

акад. *Л. И. Афтанас*
акад. *Б. В. Базаров*
чл.-корр. *Е. Г. Бережко*
акад. *В. В. Болдырев*
акад. *А. Г. Дегерменджи*
проф. *Э. Краузе (Германия)*
акад. *Н. А. Колчанов*
акад. *А. Э. Конторович*
акад. *М. И. Кузьмин*
акад. *Г. Н. Кулипанов*
д. ф.-м. н. *С. С. Кутателадзе*
проф. *Я. Липковски (Польша)*
акад. *Н. З. Ляхов*
акад. *В. И. Молодин*
д. б. н. *М. П. Мошкин*
чл.-корр. *С. В. Нетесов*
д. х. н. *А. К. Петров*
проф. *В. Сойфер (США)*
чл.-корр. *А. М. Федотов*
д. ф.-м. н. *М. В. Фокин*
д. т. н. *А. М. Харитонов*
акад. *А. М. Шалагин*
акад. *В. К. Шумный*
д. и. н. *А. Х. Элерт*

Над номером работали

к. б. н. *Л. Овчинникова*
Л. Панфилова
к. б. н. *М. Перепечаева*
Т. Морозова
А. Харкевич
к. ф. н. *Е. Игнатова*
А. Мистрюков

«Естественное желание хороших
людей – добывать знание»

Леонардо да Винчи

Периодический научно-популярный журнал

Издается с января 2004 года

Периодичность: 6 номеров в год

Учредители:

Сибирское отделение Российской
академии наук (СО РАН)

Институт физики полупроводников
им. А. В. Ржанова СО РАН

Институт археологии и этнографии
СО РАН

Лимнологический институт СО РАН

Институт геологии и минералогии
им. В. С. Соболева СО РАН

Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

Институт нефтегазовой геологии
и геофизики им. А. А. Трофимука СО РАН

ООО «ИНФОЛИО»

Издатель: ООО «ИНФОЛИО»

Адрес редакции и издателя:
630090, Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 11
Тел.: +7 (383) 330-27-22, 330-21-77
Факс: +7 (383) 330-26-67
e-mail: zakaz@infolio-press.ru
e-mail: lidia@infolio-press.ru

<https://scfh.ru>

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор)

Свидетельство ПИ № ФС77-37577
от 25 сентября 2009 г.

ISSN 2310-2500

Отпечатано в типографии
ООО «ИД „Вояж“» (Новосибирск)

Дата выхода в свет 23.10.2017

Свободная цена

Перепечатка материалов только
с письменного разрешения редакции

© Сибирское отделение РАН, 2017

© ООО «ИНФОЛИО», 2017

© Институт физики полупроводников
им. А. В. Ржанова СО РАН, 2017

© Институт археологии и этнографии
СО РАН, 2017

© Лимнологический институт СО РАН,
2017

© Институт геологии и минералогии
им. В. С. Соболева СО РАН, 2017

© Институт химической биологии
и фундаментальной медицины
СО РАН, 2017

© Институт нефтегазовой геологии
и геофизики им. А. А. Трофимука
СО РАН, 2017

Дорогие друзья!



Новый выпуск журнала подготовлен по следам прошедшей летом 2017 г. в новосибирском Академгородке конференции «Биотехнология – медицине будущего», собравшей авторитетных российских и зарубежных специалистов в самых «горячих областях» современной молекулярной биологии, которые служат фундаментом для развития актуальных направлений современной медицины.

Основную задачу медицины будущего можно определить как «управление здоровьем», и для ее решения необходимо совершенствование технологий направленного манипулирования информационными биополимерами и другими биомолекулами, генами и целыми клетками. Так как белки и нуклеиновые кислоты по сути своей являются интеллектуальными материалами, способными специфично узнавать определенные биологические мишени и на них воздействовать, на их основе можно конструировать молекулярные диагностические устройства и «умные» лекарства для таргетной («прицельной») терапии аутоиммунных, онкологических, наследственных и инфекционных заболеваний.

Образ медицины завтрашнего дня создается уже сегодня. Это – развитие репродуктивных технологий, обеспечивающих рождение детей, свободных от тяжелых наследственных заболеваний; генетические паспорта, позволяющие учесть риски развития конкретных патологий и дать рекомендации по поддержанию здоровья; индивидуальный мониторинг параметров организма с помощью высокотехнологичных устройств и цифровых технологий; использование геномного редактирования и клеточных технологий для лечения наследственных и опухолевых заболеваний; пациент-специфичная терапия препаратами на основе природных или искусственных биомолекул, разработанных непосредственно для конкретного больного, и многое другое.

Конечно, пока большая часть этого списка кажется научной фантастикой: слишком далеко все это от реалий обыденной жизни и практического здравоохранения, не говоря уже о том, что высокие технологии имеют и высокую стоимость. Сегодня выход на рынок одного лишь «интеллектуального» противоопухолевого средства требует больше 1 млрд долларов! Тем не менее события в этой области развиваются по экспоненте.

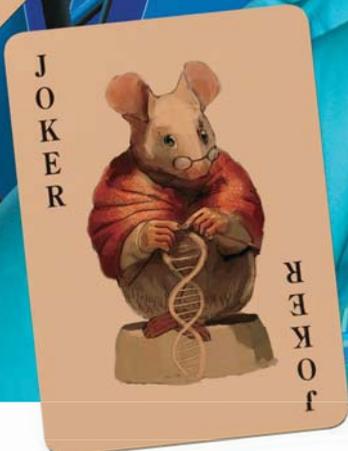
К примеру, гелевые биологические микрочипы, разработанные в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (Москва) и способные одновременно анализировать десятки молекулярных мишеней, уже активно внедряются в медицинскую диагностику ряда социально значимых заболеваний: от лейкемии и аллергий до лекарственно-устойчивого туберкулеза. В Институте биоорганической химии

им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Москва) ведутся пионерные работы по созданию сложных молекулярных наноконструкций на основе искусственных антител, предназначенных одновременно для диагностики и адресной доставки лекарств. Первый такой препарат – иммунотоксин – против одного из самых злокачественных видов рака груди, уже прошел доклинические испытания.

Медицинские технологии нового поколения успешно развиваются и в новосибирском Академгородке в Институте химической биологии и фундаментальной медицины и Институте цитологии и генетики СО РАН в тесном сотрудничестве с Новосибирским государственным университетом. Статьи новосибирских исследователей расскажут о создании нового терапевтического подхода для комбинированной химиотерапии рака, при котором мишенью являются ферменты репарации («ремонта») ДНК; о новых инструментах целевого геномного редактирования и клеточных моделях заболеваний человека для оценки эффективности лечения; об «умных» средствах лечения наследственных и инфекционных заболеваний, в том числе на основе искусственных аналогов ДНК, и об использовании модифицированных вирусных штаммов в онкотерапии.

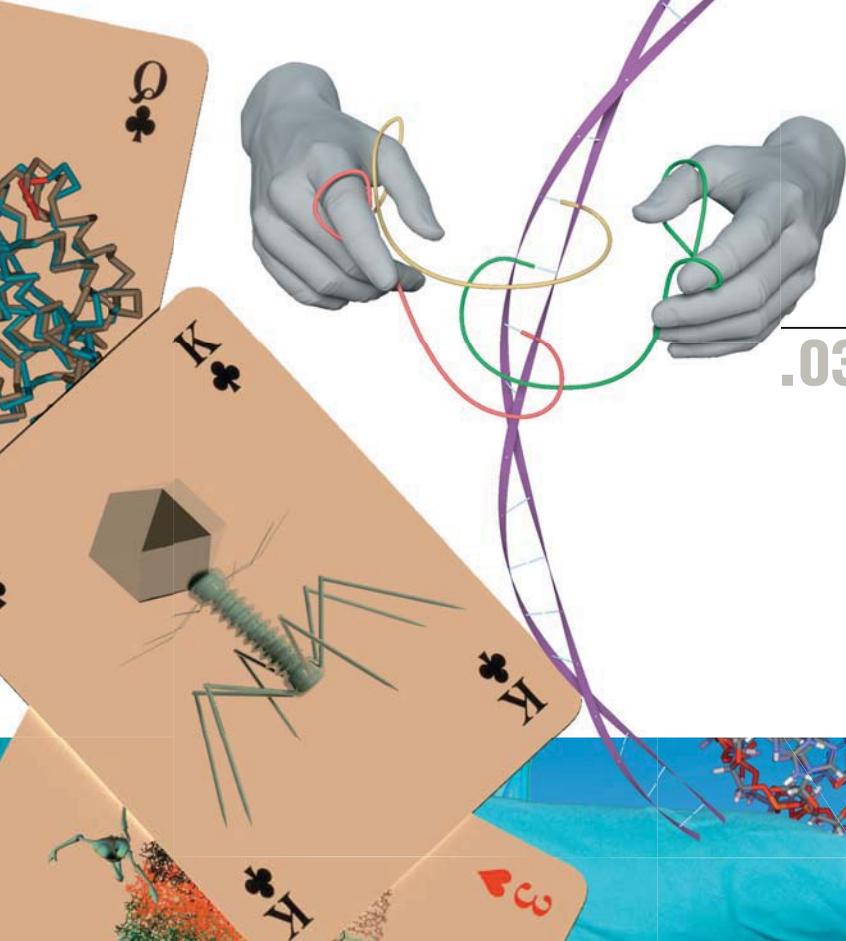
Все эти новейшие молекулярные и генетические технологии должны в будущем в корне изменить систему здравоохранения. Ее главным «объектом» станет не болезнь, а конкретный человек со всеми своими индивидуальными генетическими, физиологическими и психическими особенностями. Такая персонализированная, регенеративная и предсказательная медицина позволит не только успешно и своевременно бороться с болезнями, но и поддерживать и сохранять здоровье на долгие годы.

Академик Н. Л. Добрецов,
главный редактор



Системы «**РЕМОНТА**» ДНК, необходимые для правильной работы организма, надо «**ВЫКЛЮЧАТЬ**», чтобы повысить эффективность химио- и радиотерапии, разрушающих ДНК раковых клеток. **С. 34**

«**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОРНИ**» обнаруживаются в 40–70% случаев избыточного веса, и данные о предрасположенности к **ПЕРЕЕДАНИЮ** и **ОЖИРЕНИЮ** помогут с выбором диеты и уровня физической нагрузки. **С. 98**



.01

БИОТЕХНОЛОГИИ

- 6 **В.В. Власов, Д.В. Пышный, П.Е. Воробьев**
Биотехнологии – медицине будущего

.02

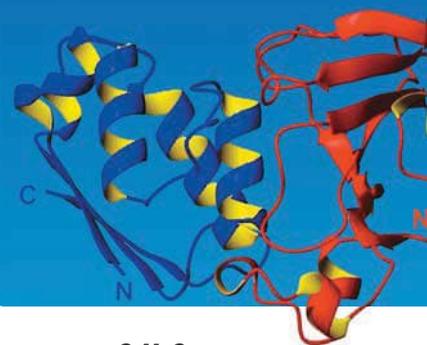
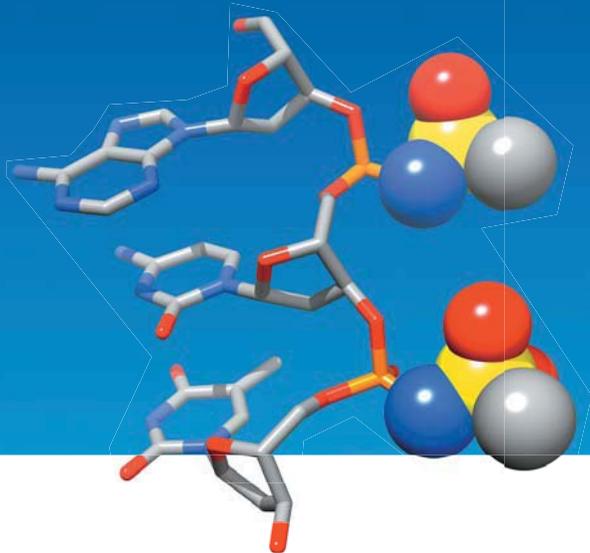
«УМНЫЕ МАТЕРИАЛЫ» В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ

- 20 **С.М. Деев**
«Самонаводящееся» лекарство, или Молекулярный наноконструктор для тараностики
- 34 **О.И. Лаврик**
Как замедление работы жизненно важных ферментов поможет в создании лекарств от рака
- 42 **Д.А. Стеценко**
Россия делает сама
Новые аналоги ДНК для лечения наследственных и инфекционных болезней
- 50 **А.С. Заседателев, Д.А. Грядунов**
Биочипы – высокие технологии в медицинской диагностике

.03

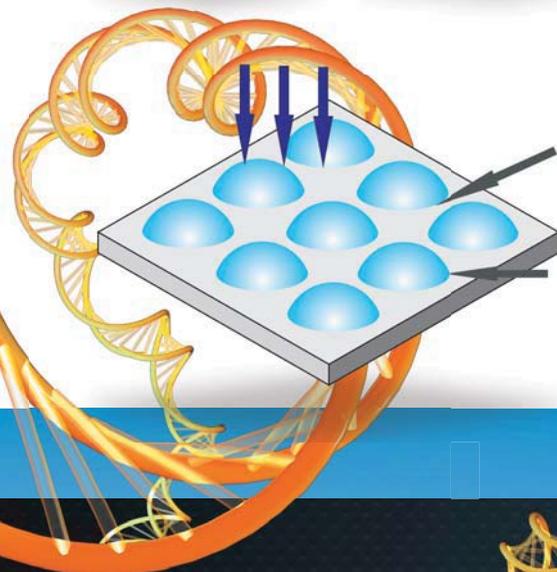
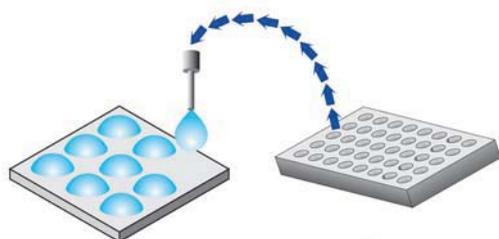
ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ГЕНОТЕРАПИЯ

- 60 **Д.О. Жарков**
Как писать и переписывать партитуру ДНК
- 70 **М.А. Лагарькова**
Клеточная экзотика в России
- 78 **А.А. Немудрый, С.М. Закиян**
Что на роду написано, того не миновать?
Редактирование генома в терапии наследственных заболеваний



ОБОЛОЧКИ ВИРУСОВ можно использовать как **КОНТЕЙНЕРЫ** для адресной **ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ** в клетки, а также в качестве безопасных вакцин. **С. 128**

В ряде зарубежных клиник прошли **УСПЕШНЫЕ ИСПЫТАНИЯ** препаратов на основе **ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ**, которые, в отличие от стандартной антираковой терапии, **ПОРАЖАЮТ ТОЛЬКО РАКОВЫЕ КЛЕТКИ**. **С. 134**



.04

ТЕХНОЛОГИИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

86 **Т.Б. Маланханова, С.М. Закиян**
CRISPR/Cas против болезни Гентингтона

90 **А.В. Баранова**
«Точная» онкология против «слабых мест» опухоли

98 **Г.И. Лифшиц, Н.В. Кох**
Генетический паспорт действителен с рождения, или Гадание на генах

106 **А.В. Баранова**
Как измерить стресс, и для чего это нужно

114 **А.В. Лысковский**
Мобильный аналитик здоровья Welltory – всегда под рукой

.05

НОВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

122 **А.И. Неуместова, А.Л. Алексева, М.А. Зенкова**
Экзосомы – межклеточная почта

128 **А.Л. Алексева, А.И. Неуместова, М.А. Зенкова**
Виросомы: старая форма, новое содержание

134 **С.В. Нетесов, Г.В. Кочнева, М.В. Романенко**
Как вирусы помогут вылечить рак





Биотехнологии — медицине будущего

Новый выпуск журнала «НАУКА из первых рук» вышел «по следам» всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», состоявшейся в новосибирском Академгородке в июле 2017 г. Среди организаторов научного форума – Институт химической биологии и фундаментальной медицины и Институт цитологии и генетики СО РАН, а также Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, где биомедицинские исследования ведутся в рамках стратегической академической единицы «Синтетическая биология», объединяющей ряд российских и зарубежных участников, в первую очередь институты СО РАН биологического профиля. В первой, вводной статье выпуска ее авторы дают обзор самых актуальных направлений и перспективных результатов исследований, связанных с разработкой и внедрением в практическую медицину новых генно-инженерных, клеточных, тканевых, иммунобиологических и цифровых технологий, часть из которых детально представлена в других статьях номера

Стремительное развитие биологической науки, обусловленное появлением высокопроизводительных приборов и созданием методов манипулирования информационными биополимерами и клетками, подготовило фундамент для развития медицины будущего. В результате исследований последних лет были разработаны эффективные диагностические методы, появились возможности для рационального конструирования противовирусных, противобактериальных и противоопухолевых препаратов, средств генотерапии и геномного редактирования. Современные биомедицинские технологии все в большей степени начинают влиять на экономику и определять качество жизни людей.

К настоящему времени детально исследованы строение и функции основных биологических молекул и разработаны методы синтеза белков и нуклеиновых кислот. Эти биополимеры по своей природе являются «интеллектуальными» материалами, так как способны высокоспецифично «узнавать» и воздействовать на определенные биологические мишени. Путем

направленного «программирования» таких макромолекул можно создавать рецепторные молекулярные конструкции для аналитических систем, а также лекарственные препараты, избирательно воздействующие на конкретные генетические программы или белки.

«Интеллектуальные препараты», созданные методами синтетической биологии, открывают возможности для *таргетной* (целенаправленной) терапии аутоиммунных, онкологических, наследственных и инфекционных заболеваний. Это дает основание говорить о внедрении в медицинскую практику подходов персонализированной медицины, ориентированной на лечение конкретного человека.

С помощью современных медицинских технологий и фармпрепаратов сегодня удается излечивать многие болезни, представлявшие в прошлом огромную медицинскую проблему. Но с развитием практической медицины и ростом продолжительности жизни все более актуальной становится задача здравоохранения в самом прямом смысле этого слова: не просто бороться с болезнями, но поддерживать имеющееся здоровье, чтобы



ВЛАСОВ Валентин Викторович – академик РАН, научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), заведующий кафедрой молекулярной биологии и биотехнологии Новосибирского государственного университета. Лауреат Государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор более 520 научных работ и 30 патентов

© В. В. Власов, Д. В. Пышный, П. Е. Воробьев, 2017



ПЫШНЫЙ Дмитрий Владимирович – член-корреспондент РАН, доктор химических наук, директор и заведующий лабораторией биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор более 160 научных работ и 15 патентов

Ключевые слова: биотехнология, медицина будущего, синтетическая биология, терапевтические нуклеиновые кислоты, антитела, аптамеры, бактериофаги, биосенсоры.



ВОРОБЬЕВ Павел Евгеньевич – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск), доцент кафедры молекулярной биологии и биотехнологии Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор 25 научных работ

Key words: biotechnology, future medicine, synthetic biology, nucleic acid therapeutics, antibodies, aptamers, phages, biosensors

БУДЕМ ЗДОРОВЫ!

Современные методы геномного секвенирования широко внедряются в медицину, и в ближайшем будущем все пациенты будут иметь генетические паспорта. Сведения о наследственных особенностях пациента – основа прогностической персонализированной медицины. Предупрежденный, как известно, вооружен. Человек, осведомленный о возможных рисках, может организовать свою жизнь таким образом, чтобы не допустить развития заболевания. Это касается и образа жизни, и выбора продуктов питания и терапевтических препаратов.

При условии постоянного отслеживания набора маркеров, сигнализирующих об отклонениях в работе организма, можно вовремя провести их коррекцию. Уже сейчас существует множество методов мониторинга состояния организма: например, с помощью датчиков, следящих за работой сердечно-сосудистой системы и качеством сна или устройств, анализирующих газообразные продукты в выдыхаемом человеком воздухе. Огромные возможности открываются в связи с развитием малоинвазивных технологий жидкостной биопсии и технологий анализа белков и пептидов, циркулирующих в кровотоке. На ранних стадиях болезни корректировать состояние организма во многих случаях можно «мягкими» методами: меняя характер питания, используя добавочные

микроэлементы, витамины и пробиотики. В последнее время особое внимание уделяется возможностям коррективы отклонений в составе кишечной микрофлоры человека, которые ассоциированы с развитием большого числа патологических состояний.

Подробнее на с. 98—105



человек мог вести активный образ жизни и оставаться полноценным членом общества до глубокой старости.

Такую задачу можно решить, обеспечив постоянный эффективный контроль за состоянием организма, который позволил бы избегать действия неблагоприятных факторов и предупреждать развитие заболевания, выявляя патологический процесс на самом раннем этапе, и ликвидировать саму причину возникновения болезни.

В этом смысле основную задачу медицины будущего можно сформулировать как «управление здоровьем». Сделать это вполне реально, если иметь полную информацию о наследственности человека и обеспечить мониторинг ключевых показателей состояния организма.

«Умная» диагностика

Для управления здоровьем необходимо иметь эффективные и простые малоинвазивные методы ранней диагностики заболеваний и определения индивидуальной чувствительности к терапевтическим препаратам, а также факторам внешней среды. Например, должны

быть решены (и уже решаются) такие задачи, как создание систем для генной диагностики и выявления возбудителей инфекционных заболеваний человека, разработка методов количественного определения белков и нуклеиновых кислот – маркеров заболеваний.

Отдельно стоит выделить создание методов ранней неинвазивной диагностики (*жидкостная биопсия*) опухолевых заболеваний, основанных на анализе внеклеточной ДНК и РНК. Источником таких нуклеиновых кислот служат как погибшие, так и живые клетки. В норме их концентрация относительно низка, но обычно возрастает при стрессе и развитии патологических процессов. При возникновении злокачественной опухоли в кровоток попадают нуклеиновые кислоты, выделяемые раковыми клетками, и такие характерные циркулирующие РНК и ДНК могут служить маркерами заболевания.

Сейчас на основе подобных маркеров разрабатываются подходы к ранней диагностике рака, методы прогнозирования риска его развития, а также оценки степени тяжести течения болезни и эффективности терапии. Например, в Институте химической биологии

Во время развития онкологических заболеваний клетки подвергаются эпигенетическим модификациям, таким как метилирование ДНК. Это приводит к инактивации генов-супрессоров опухолевого роста, а характер метилирования некоторых генов может служить одним из диагностических опухолевых маркеров (Павлов и др., 2011).

На графике – степень метилирования нуклеотида цитозина в промоторной области гена глутатион-S-трансферазы P1 (GSTP1). Этот показатель заметно различается у здоровых мужчин и больных раком предстательной железы



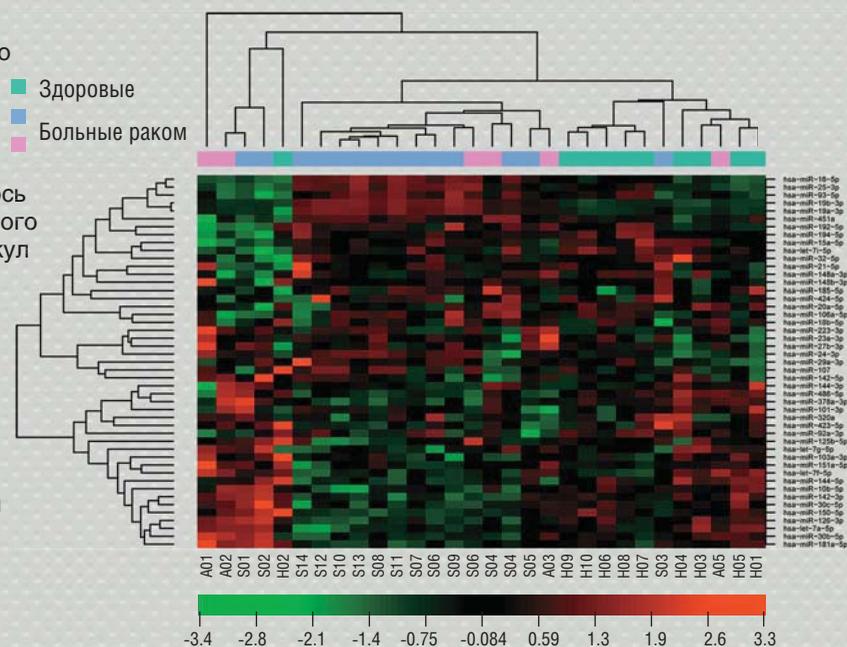
и фундаментальной медицины СО РАН было показано, что при раке предстательной железы повышается степень метилирования определенных участков ДНК. Был разработан метод, позволяющий выделить из образцов крови циркулирующую ДНК и проанализировать характер ее метилирования. Этот способ может стать основой точной неинвазивной диагностики рака простаты, которой на сегодня не существует.

Важным источником информации о состоянии здоровья могут служить так называемые некодирующие РНК, т.е. те РНК, которые не являются матрицей для

синтеза белков. За последние годы было установлено, что в клетках образуется множество различных некодирующих РНК, участвующих в регуляции самых разных процессов на уровне клеток и всего организма. Изучение спектра микроРНК и длинных некодирующих РНК при различных состояниях открывает широкие возможности для быстрой и эффективной диагностики. В Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН (ИМКБ СО РАН, Новосибирск) и ИХБФМ СО РАН идентифицирован ряд микроРНК – перспективных маркеров опухолевых заболеваний.

В ИХБФМ СО РАН методом высокопроизводительного параллельного секвенирования на платформе SOLiD проанализировано разнообразие малых некодирующих РНК в плазме крови у здоровых людей и больных немелкоклеточным раком легкого. Удалось охарактеризовать изменения внеклеточного транскриптома (совокупности всех молекул РНК, синтезирующихся в организме человека при образовании злокачественных опухолей).

На диаграмме отражены уровни экспрессии микроРНК в образцах, полученных от здоровых доноров и пациентов с плоскоклеточной карциномой. Анализ этой информации позволил установить значимые различия в уровнях экспрессии 18 микроРНК у здоровых и больных людей, что может иметь потенциальную диагностическую ценность (Ponomyarova, Morozkin et al., 2016)



УЗНАТЬ ВРАГА В ЛИЦО

Современные технологии с применением биологических микрочипов позволяют быстро и эффективно идентифицировать возбудителей ряда болезней (туберкулеза, СПИДа, гепатитов В и С, сибирской язвы, инфекций новорожденных), фиксировать наличие определенных биотоксинов, определять хромосомные транслокации при лейкозах, регистрировать белковые маркеры онкозаболеваний, определять генетическую предрасположенность к болезням и индивидуальную чувствительность к некоторым типам терапии. Технологии также можно использовать для генетической идентификации личности при проведении судебно-генетических экспертиз и формирования баз данных ДНК. ИХБФМ СО РАН участвовал в реализации двух крупных международных проектов по разработке олигонуклеотидных микрочипов, финансируемых американской Программой сотрудничества в области биотехнологий Департамента здравоохранения США (*Biotechnology Engagement Program, US Department of Health and Human Services, ВТЕР/ДННС*). В рамках первого проекта с участием специалистов ИМБ им. В. А. Энгельгардта созданы микрочипы, позволяющие точно идентифицировать различные штаммы вирусов оспы и герпеса. Были разработаны два варианта конструкции микрочипов (на стеклянной подложке и с гелевыми спотами), а также портативный флуоресцентный детектор для их анализа. В рамках второго проекта был создан универсальный микрочип для типирования вируса гриппа А, позволяющий достоверно различать 30 подтипов этого вируса на основе определения двух поверхностных белков вируса – гемагглютинаина и нейраминидазы



Гелевый биочип для определения генотипа и подтипа вируса гепатита С, созданный в ИМБ РАН (Москва).
 Фото из архива лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН.
 Подробнее на с. 50—59

С помощью современных технологий секвенирования РНК и ДНК может быть создана платформа для диагностики и прогноза онкологических заболеваний человека на основе анализа содержания микроРНК и генотипирования, т. е. установления конкретных генетических вариантов того или иного гена, а также для определения профилей *экспрессии* (активности) генов. Такой подход предполагает возможность быстрого и одновременного проведения множества анализов с помощью современных устройств – *биологических микрочипов*.

Биочипы представляют собой миниатюрные приборы для параллельного анализа специфических биологических макромолекул. Идея создания подобных устройств родилась в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (Москва) еще в конце 1980-х гг. За короткое время биочиповые технологии выделились в самостоятельную область анализа с огромным спектром практических приложений, от исследования фундаментальных проблем молекулярной биологии и молекулярной эволюции до выявления лекарственно устойчивых штаммов бактерий.

Сегодня в ИМБ РАН производятся и используются в медицинской практике оригинальные тест-системы для идентификации возбудителей ряда социально значимых инфекций, в том числе таких как туберкулез, с одновременным выявлением их резистентности к антимикробным препаратам; тест-системы для оценки индивидуальной переносимости препаратов группы цитостатиков и многое другое.

Развитие биоаналитических диагностических методов требует постоянно повышения *чувствительности* – способности давать достоверный сигнал при регистрации малых количеств детектируемого вещества. *Биосенсоры* –

Мировой лидер «биочипостроения» – американская компания Affymetrix Inc. – производит биочипы с высокой плотностью молекулярных зондов, основываясь на фотолитографических технологиях, использующихся для получения полупроводниковых микросхем. На одном таком чипе на площади менее 2 см² могут располагаться миллионы точек-спотов размером в несколько микрон. Каждая подобная точка содержит несколько миллионов одинаковых олигонуклеотидов, ковалентно связанных с поверхностью микрочипа

это новое поколение устройств, позволяющих специфично анализировать содержание различных маркеров заболеваний в образцах сложного состава, что особенно важно при диагностике заболеваний.

ИХБФМ СО РАН в сотрудничестве с новосибирским Институтом физики полупроводников СО РАН разрабатывает микробиосенсоры на основе *полевых транзисторов*, являющихся одними из самых чувствительных аналитических устройств. Такой биосенсор позволяет в реальном времени отслеживать взаимодействие биомолекул. Его составной частью является одна из таких взаимодействующих молекул, которая играет роль молекулярного зонда. Зонд захватывает из анализируемого раствора молекулярную мишень, по наличию которой можно судить о конкретных характеристиках здоровья пациента.

«Комплементарное» лекарство

Расшифровка геномов человека и возбудителей различных инфекций открыла дорогу для разработки радикальных подходов к терапии болезней путем направленного воздействия на их первопричину – генетические программы, ответственные за развитие патологических процессов. Глубокое понимание механизма возникновения заболевания, в который вовлечены нуклеиновые кислоты, дает возможность сконструировать терапевтические нуклеиновые кислоты, восполняющие утраченную функцию либо блокирующие возникшую патологию.

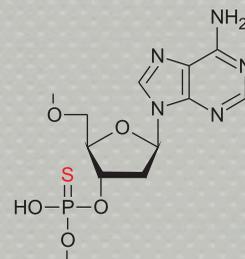
Такое воздействие может быть осуществлено с помощью фрагментов нуклеиновых кислот – синтетических *олигонуклеотидов*, способных избирательно взаимодействовать с определенными нуклеотидными последовательностями в составе генов-мишеней по принципу *комплементарности*. Сама идея использовать олигонуклеотиды для направленного воздействия на гены была впервые выдвинута в лаборатории природных полимеров (впоследствии – отдел биохимии) Новосибирского института биоорганической химии СО РАН (ныне – Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). В Новосибирске были созданы и первые препараты *ген-направленного действия* для избирательной инактивации вирусных и некоторых клеточных РНК.

Подобные ген-направленные терапевтические препараты сегодня активно разрабатываются на основе нуклеиновых кислот, их аналогов и конъюгатов (антисмысловых олигонуклеотидов, интерферирующих РНК, аптамеров, систем геномного редактирования). Исследования последних лет показали, что на основе *антисмысловых олигонуклеотидов* можно получить широкий спектр биологически активных веществ, действующих на различные генетические структуры и запускающих процессы, приводящие к временному «выключению» генов либо изменению генетических программ – появлению *мутаций*. Было доказано, что с помощью подобных соединений можно подавить функционирование определенных *матричных РНК* живой клетки, воздействуя на синтез белков, а также защитить клетки от вирусной инфекции.

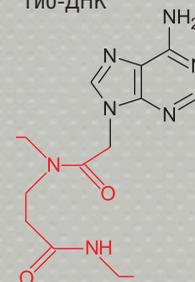
Сегодня антисмысловые олигонуклеотиды и РНК, подавляющие функции мРНК и вирусных РНК, применяются не только в биологических исследованиях. Ведутся испытания ряда противовирусных и противовоспалительных препаратов, созданных на основе искусственных аналогов олигонуклеотидов, а некоторые из них уже начинают внедряться в клиническую практику.

Лаборатория биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН, работающая в этом направлении, была создана в 2013 г. благодаря научному мегагранту

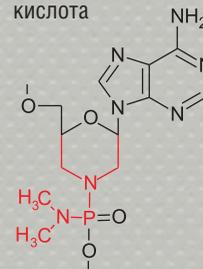
Двучечечные молекулы нуклеиновых кислот, ДНК и РНК, формируются благодаря взаимодействию пар нуклеотидов, способных к взаимному узнаванию и образованию комплексов за счет формирования водородных связей. Это свойство называется «комплементарностью»



Тио-ДНК

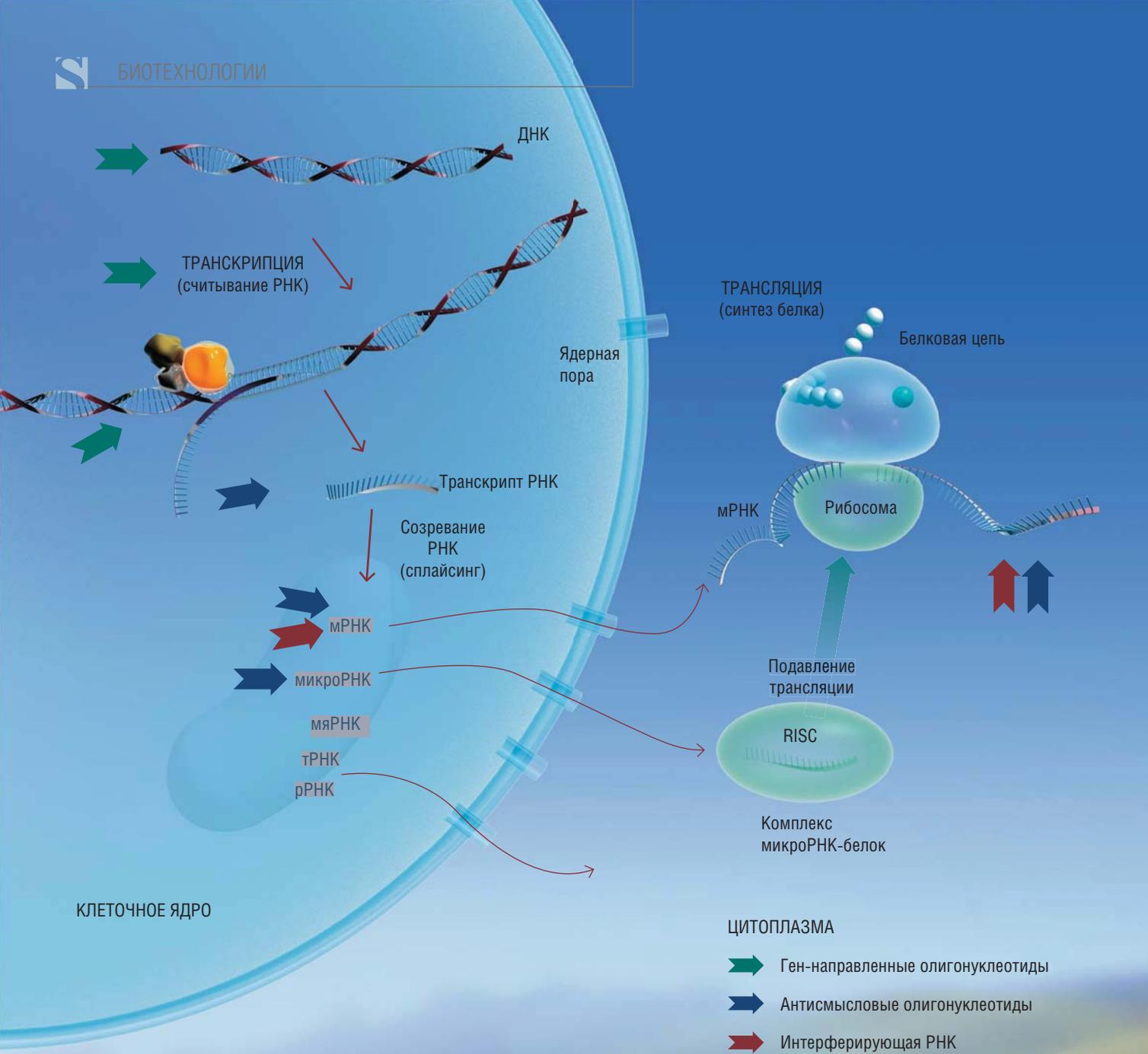


Пептидо-нуклеиновая кислота



Морфолино

В качестве терапевтических олигонуклеотидов наиболее широко применяются их аналоги с различными модификациями рибозофосфатного скелета, которые регулируют специфичность формирования комплементарных комплексов с целевой ДНК и повышают устойчивость олигонуклеотидов, не увеличивая токсичность
По: (Власов и др., 2014)



Регулировать экспрессию генов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов можно на разных уровнях, начиная с процесса «транскрипции» – считывания генетической информации с ДНК на РНК, который происходит в ядре клетки и включает в себя стадию созревания РНК, в результате чего образуется пул молекул РНК с разными функциями (транспортная тРНК, переносящая аминокислоты; рибосомальная рРНК, входящая в состав рибосом; и т. д.), заканчивая процессом «трансляции» – синтезом белка на матричной РНК (мРНК), который происходит в цитоплазме на рибосомах. Все терапевтические олигонуклеотиды традиционно принято подразделять на «ген-направленные» – их мишенью является геномная ДНК и на собственно «антисмысловые» – их мишенью являются РНК. Отдельно выделяют группу олигонуклеотидов, работающих по механизму РНК-интерференции.

По: (Власов и др., 2014)

«ЛЕЧИМ» БЕЛОК

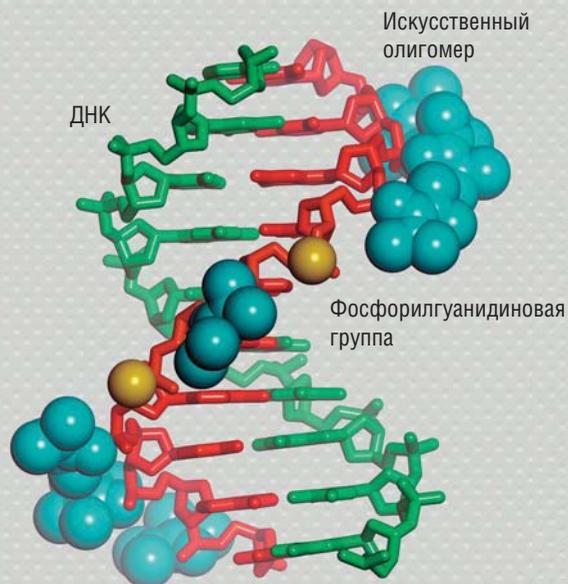
Регуляция экспрессии генов под действием «антисмысловых» олигонуклеотидов возможна на различных уровнях. Так, олигонуклеотиды, комплементарные последовательности матричной РНК, подавляют экспрессию генов на стадии трансляции, т. е. синтеза белка. Но терапевтические нуклеиновые кислоты могут вмешиваться и в другие молекулярно-биологические процессы, например, исправлять нарушения в процессе сплайсинга при созревании мРНК. При одном из таких нарушений в клетках синтезируется «неправильный» дистрофин – белок, являющийся важным структурным компонентом мышечной ткани. Это приводит к возникновению тяжелого заболевания – миодистрофии Дюшенна. В ИХБФМ СО РАН разработаны терапевтические олигонуклеотиды для лечения этого заболевания, и уже подана заявка на соответствующий патент.

Подробнее на с. 42—49

Правительства РФ. Ее организатором стал профессор Йельского университета, Нобелевский лауреат С. Альтман. В лаборатории ведутся исследования физико-химических и биологических свойств новых перспективных искусственных олигонуклеотидов, на основе которых разрабатываются РНК-направленные противобактериальные и противовирусные препараты.

В рамках проекта, руководимого С. Альтманом, было выполнено масштабное систематическое исследование воздействия различных искусственных аналогов олигонуклеотидов на патогенные микроорганизмы: синегнойную палочку, сальмонеллу, золотистый стафилококк, а также вирус гриппа. Были определены гены-мишени, воздействием на которые можно наиболее эффективно подавить эти патогены; проводится оценка технологических и терапевтических характеристик

Среди коммерческих фирм лидером в создании терапевтических нуклеиновых кислот является американская компания *Ionis Pharmaceuticals, Inc.* (США). После многолетних клинических исследований были введены в медицинскую практику антисмысловые препараты: *Kynamro* – снижающий уровень «плохого» холестерина, *Alicaforsen* – для лечения язвенного колита и *Spinraza* – для терапии дистрофии Дюшенна. Препараты *Ionis* против ряда других заболеваний проходят клинические испытания. Лидер в создании терапевтических интерферирующих РНК – компания *Alynham Pharmaceuticals* – также проводит клинические испытания целой серии препаратов для лечения тяжелых заболеваний (таких как наследственный амилоидоз, тяжелые формы гиперхолестеролемии, гемофилия), эффективные методы терапии которых в настоящее время отсутствуют

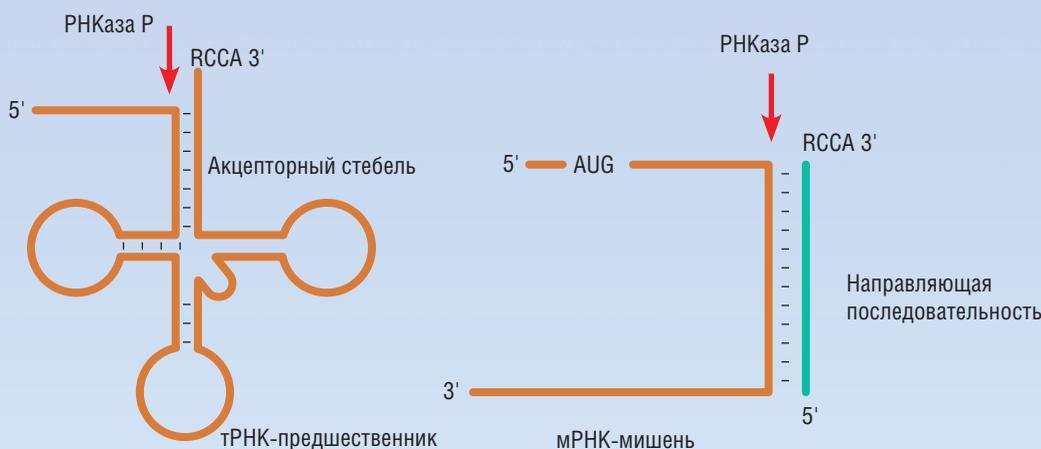


Комплементарный комплекс фрагмента ДНК-мишени с олигонуклеотидом, содержащим фосфорилгуанидиновые группы, оказался почти таким же устойчивым, как и природная спираль ДНК.
По: (Пышный, Стеценко, 2014)

самых действующих аналогов олигонуклеотидов, в том числе проявляющих антибактериальную и противовирусную активность.

В ИХБФМ СО РАН впервые в мире были синтезированы *фосфорилгуанидиновые* производные олигонуклеотидов. Эти новые соединения электронейтральны, устойчивы в биологических средах и прочно связываются с РНК- и ДНК-мишенями в широком диапазоне условий. Благодаря спектру уникальных свойств они перспективны для применения в качестве терапевтических агентов, а также могут быть использованы для повышения эффективности средств диагностики, основанных на биочиповых технологиях.

«Антисмысловое» воздействие на матричные РНК не ограничивается простым блокированием *сплайсинга* (процесса «созревания» РНК) или синтеза белка. Более эффективным является ферментативное разрезание мРНК, спровоцированное связыванием терапевтического олигонуклеотида с мишенью. При этом олигонуклеотид – индуктор расщепления – может в дальнейшем связаться с другой молекулой РНК и повторить свое действие. В ИХБФМ СО РАН исследовали действие олигонуклеотидов, образующих при связывании с мРНК комплексы, которые могут служить субстратами фермента РНКазы Р. Этот фермент и сам представляет собой РНК с каталитическими свойствами (*рибозим*).



Чрезвычайно мощным средством подавления активности генов оказались не только антисмысловые нуклеотиды, но и двуцепочечные РНК, действующие по механизму *РНК-интерференции*. Суть этого явления в том, что, попадая в клетку, длинные дцРНК разрезаются на короткие фрагменты (так называемые *малые интерферирующие РНК*, siРНК), комплементарные определённому участку матричной РНК. Связываясь с такой мРНК, siРНК запускают действие ферментативного механизма, разрушающего молекулу-мишень.

Использование этого механизма открывает новые возможности для создания широкого спектра высокоэффективных нетоксичных препаратов для подавления экспрессии практически любых, в том числе вирусных, генов. В ИХБФМ СО РАН на основе малых интерферирующих РНК сконструированы перспективные противоопухолевые препараты, показавшие хорошие результаты в экспериментах на животных. Одна из интересных находок – двуцепочечные РНК оригинального строения, стимулирующие в организме производство *интерферона*, эффективно подавляющие процесс метастазирования опухолей. Хорошее проникновение препарата в клетки обеспечивают носители – новые катионные *липосомы* (липидные пузырьки), разработанные совместно со специалистами Московского государственного университета тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова.

Новые роли нуклеиновых кислот

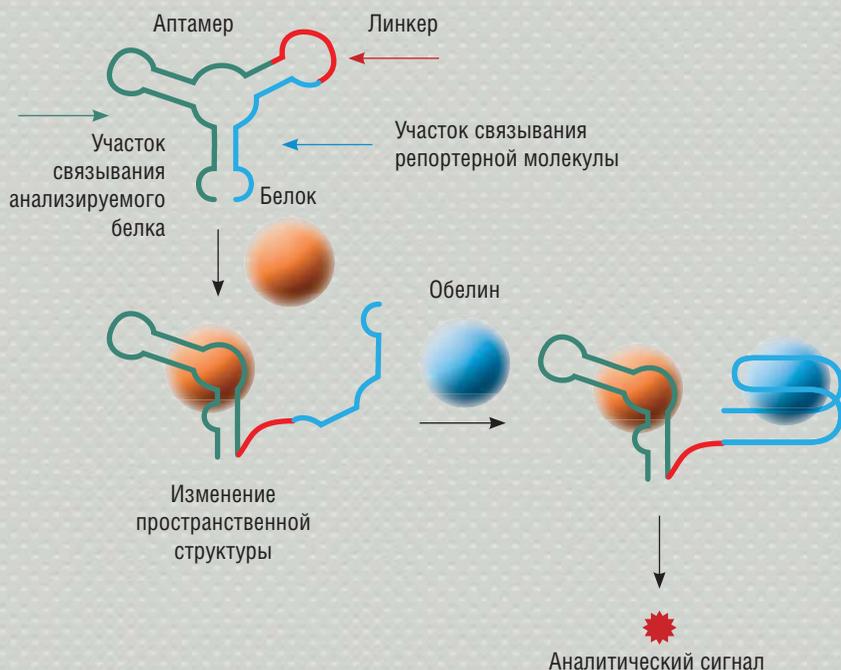
Разработка метода полимеразной цепной реакции, позволяющего в неограниченных количествах размножать нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК, и появление технологий молекулярной селекции нуклеиновых кислот сделали возможным создание искусственных РНК

Фермент РНКазы Р обычно занимается удалением нуклеотидов с определённого (5'-) конца молекулы РНК – предшественника транспортной РНК, структура которого напоминает «клеверный лист». Но фермент может делать это с фрагментом любой РНК, который будет напоминать «стебелек листа»: главное, чтобы в этом месте была двуцепочечная, и рядом находился другой (3'-) свободный конец молекулы. Такую структуру можно получить с помощью направляющего олигонуклеотида, что позволит разрезать РНК-мишень в строго определённом месте. По: (Альтман, 2014)

и ДНК с заданными свойствами. Молекулы нуклеиновых кислот, избирательно связывающие определённые вещества, называются *аптамерами*. На их основе могут быть получены препараты, блокирующие функции любых белков: ферментов, рецепторов или регуляторов активности генов. В настоящее время получены уже тысячи самых разных аптамеров, находящихся широкое применение в медицине и технике.

Один из мировых лидеров в этой области – американская компания *Soma Logic Inc.* – создает так называемые *сомамеры*, которые селективно отбирают из библиотек химически модифицированных нуклеиновых кислот по уровню сродства к тем или иным мишеням. Модификации по азотистому основанию придают таким аптамерам дополнительную «белковоподобную» функциональность, что обеспечивает высокую стабильность их комплексам с мишенями. Кроме того, это увеличивает вероятность успешного отбора сомамеров к тем соединениям, к которым подобрать обычные аптамеры не удалось.

Среди аптамеров, имеющих сродство к клинически значимым мишеням, к настоящему времени имеются



Принцип действия переключаемого аптасенсора на основе бивалентного аптамера базируется на последовательном связывании с анализируемой и репортерной молекулой. Аптамер представляет собой молекулу ДНК или РНК, в состав которой входят два узнающих фрагмента (зеленый и голубой на схеме) и соединительный участок (красный). Один из узнающих фрагментов может связывать только молекулу анализируемого белка, например гликированный гемоглобин. Другой узнающий фрагмент, связывающийся с репортерной молекулой (например, люминесцентным белком обелином), начинает «работать» только после захвата молекулы-мишени, что определенным образом изменяет пространственную структуру всего сенсора (Vorobyeva, Vorobjev *et al.*, 2016)

Развитие синтетической биологии происходит на базе революционного прорыва в области олигонуклеотидного синтеза. Синтез искусственных генов стал возможным благодаря созданию высокопроизводительных синтезаторов генов, в которых использованы микро- и нанофлюидные системы. Сегодня созданы приборы, позволяющие быстро «собирать» искусственные гены и/или бактериальные и вирусные геномы, аналоги которых в природе отсутствуют.

Примером развития микрочиповых технологий могут служить американская фирма *LC Sciences* и немецкая *Febit GmbH*. Биочиповый реактор производства *LC Sciences* с использованием стандартных реагентов для олигонуклеотидного синтеза позволяет одновременно синтезировать 4–8 тыс. разных олигонуклеотидов. Микрочиповый реактор фирмы *Febit GmbH* состоит из 8 независимых фрагментов, на каждом из которых одновременно синтезируется до 15 тыс. разных олигонуклеотидов. За сутки таким образом можно получить до полумиллиона олигонуклеотидов – строительных блоков будущих генов

кандидаты на терапевтические препараты, достигшие третьей, ключевой фазы клинических испытаний. Один из них – *Macugen* – уже используется в клинической практике для терапии заболеваний сетчатки глаза; препарат для лечения возрастной макулярной дегенерации сетчатки *Fovista* успешно заканчивает испытания. И на очереди множество подобных препаратов.

Но терапия – это не единственное предназначение аптамеров: они вызывают огромный интерес у биоаналитиков в качестве распознающих молекул при создании *аптамерных биосенсоров*.

В ИХБФМ совместно с Институтом биофизики СО РАН (Красноярск) разрабатываются биOLUMИнесцентные аптасенсоры с переключаемой структурой. Получены аптамеры, которые играют роль репортерного блока сенсора, к Ca^{2+} -активируемому фотопротеину *обелину*, представляющему собой удобную биOLUMИнесцентную метку. Этот сенсор способен «улавливать» молекулы лишь определенных белков, которые необходимо детектировать в образце. В настоящее время по этой схеме конструируются переключаемые

биосенсоры к модифицированным белкам крови, служащим маркерами диабета.

Новым объектом среди терапевтических нуклеиновых кислот является и сама матричная (информационная) РНК. Компания *Moderna Therapeutics* (США) сейчас проводит масштабные клинические исследования мРНК. При попадании в клетку мРНК действуют в ней как ее собственные. В результате клетка получает возможность производить белки, которые могут предотвратить или остановить развитие заболевания. Большая часть таких потенциальных терапевтических препаратов направлена против инфекционных (вирус гриппа, вирус Зика, цитомегаловирус и др.) и онкологических заболеваний.

Белки как лекарство

Огромные успехи синтетической биологии за последние годы отразились и в разработке технологий производства терапевтических белков, уже широко применяющихся в клинике. В первую очередь это относится к противоопухолевым антителам, с помощью которых стала возможной эффективная терапия целого ряда онкологических заболеваний.

Сейчас появляются все новые противоопухолевые белковые препараты. Примером может служить препарат *лактаптин*, созданный в ИХБФМ СО РАН на основе фрагмента одного из основных белков молока человека. Исследователи обнаружили, что этот пептид индуцирует *апоптоз* («самоубийство») клеток стандартной опухолевой клеточной культуры – аденокарциномы молочной железы человека. С использованием методов генной инженерии был получен ряд структурных аналогов лактаптина, из которых был выбран наиболее эффективный.

Испытания на лабораторных животных подтвердили безопасность препарата и его противоопухолевую и антиметастатическую активность в отношении ряда опухолей человека. Уже разработана технология получения лактаптина в субстанции и лекарственной форме, изготовлены первые экспериментальные партии препарата.

Терапевтические антитела все шире применяются и для лечения вирусных инфекций. Специалистам ИХБФМ СО РАН удалось генно-инженерными методами создать гуманизированное антитело против вируса клещевого энцефалита. Препарат прошел все доклинические испытания, доказав свою высокую эффективность. Оказалось, что защитные свойства искусственного антитела в сто раз выше, чем коммерческого препарата антител, получаемого из сыворотки доноров.

Вторжение в наследственность

Открытия последних лет расширили возможности генотерапии, которые до недавнего времени представлялись фантастикой. Технологии *геномного редактирования*, основанные на применении РНК-белковой системы CRISPR/Cas, способны распознавать определенные последовательности ДНК и вносить в них разрывы. При «ремонте» (*репарации*) таких нарушений можно исправлять мутации, ответственные за заболевания, или вводить в терапевтических целях новые генетические элементы.

Редактирование генов открывает перспективы радикального решения проблемы генетических заболеваний путем модификации генома при использовании *экстракорпорального оплодотворения*. Принципиальная возможность направленного изменения генов эмбриона



Доклинические испытания препарата лактаптина на лабораторных животных, которым была привита злокачественная опухоль, показали его терапевтическую эффективность (Рихтер, 2013). На фото – лабораторная мышь, которой вводился лактаптин (справа), и животное, не получавшее лечения лактаптином (слева). Вверху – образцы экспериментальной партии препарата

человека уже доказана экспериментально, и создание технологии, обеспечивающей появление на свет детей, свободных от наследственных заболеваний, задача ближайшего будущего.

С помощью геномного редактирования можно не только «исправлять» гены: этот подход можно использовать для борьбы с вирусными инфекциями, не поддающимися обычной терапии. Речь идет о вирусах, встраивающих свой геном в клеточные структуры организма, где он оказывается недоступным для современных противовирусных препаратов. К таким вирусам относятся ВИЧ-1, вирусы гепатита В, папилломавирусы, полиомавирусы и ряд других. Системы геномного редактирования могут инактивировать вирусную ДНК внутри клетки, разрезав ее на безопасные фрагменты либо внося в нее инактивирующие мутации.

Очевидно, что применение системы CRISPR/Cas в качестве средства коррекции мутаций человека станет возможным лишь после ее усовершенствования с целью обеспечения высокого уровня специфичности и проведения широкого спектра испытаний. Кроме того, для успешной борьбы с опасными вирусными инфекциями необходимо решить проблему эффективной доставки терапевтических агентов в целевые клетки.

Сначала была клетка – стволовая

Одним из наиболее быстро развивающихся направлений в медицине является *клеточная терапия*. В ведущих странах уже проходят клинические испытания клеточных технологий, разработанных для лечения аутоиммунных, аллергических, онкологических и хронических вирусных заболеваний.

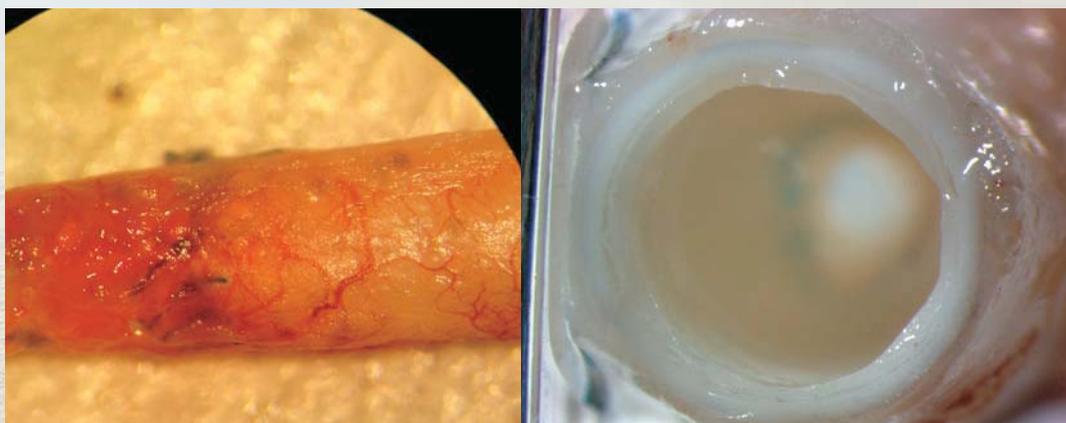
В России пионерные работы по созданию средств терапии на основе *стволовых клеток* и клеточных вакцин были выполнены в Институте фундаментальной и клинической иммунологии СО РАН (Новосибирск). В результате исследований были разработаны методы лечения онкологических заболеваний, гепатита В и аутоиммунных заболеваний, которые уже начали применяться в клинике в экспериментальном режиме.

Чрезвычайно актуальными в наши дни стали проекты создания банков культур клеток пациентов с наследственными и онкологическими заболеваниями для тестирования фармакологических препаратов. В Новосибирском научном центре такой проект уже реализуется межинститутским коллективом под руководством

проф. С. М. Закияна. Новосибирские специалисты отработали технологии внесения мутаций в культивируемые клетки человека, в результате чего были получены клеточные модели таких заболеваний, как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, спинальная мышечная атрофия, синдром удлиненного интервала QT и гипертрофическая кардиомиопатия.

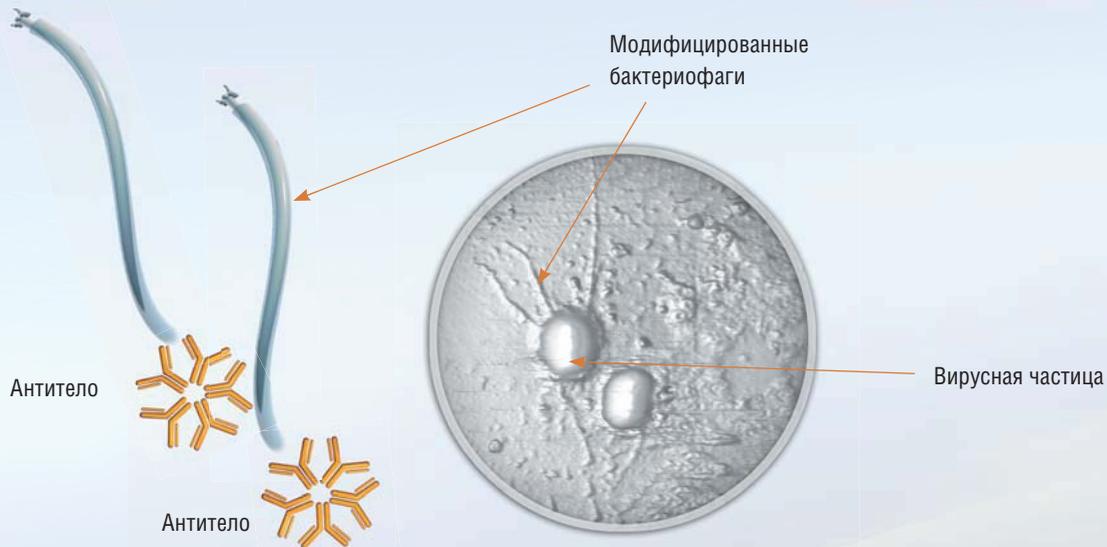
Разработка методов получения из обычных соматических клеток *плюрипотентных стволовых*, способных превратиться в любую клетку взрослого организма, привела и к появлению клеточной инженерии, позволяющей восстанавливать пораженные структуры организма. Удивительно быстро развиваются технологии получения трехмерных структур для клеточной и тканевой инженерии на основе биоразрушаемых полимеров: протезов сосудов, трехмерных матриц для выращивания хрящевой ткани и конструирования искусственных органов.

Так, специалисты ИХБФМ СО РАН и Национального медицинского исследовательского центра им. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск) разработали технологию создания протезов сосудов и сердечных клапанов методом *электроспиннинга*. С помощью этой технологии из раствора полимера можно получить волокна толщиной от десятков нанометров до нескольких микрон. В результате серии экспериментов удалось отобрать изделия с выдающимися физическими характеристиками, которые сейчас успешно проходят доклинические испытания. Благодаря высокой био- и гемосовместимости такие протезы со временем замещаются собственными тканями организма.



Новосибирским специалистам удалось разработать искусственные протезы кровеносных сосудов, по своим свойствам практически не отличающиеся от природных. Полимерные заготовки имеют высокую механическую устойчивость и прочность, способны поддерживать популяции мышечных и эндотелиальных клеток, удобны для манипуляции и не вызывают воспалительной реакции (Лактионов и др., 2013).

На фото – протезы кровеносного сосуда (*слева*) и сердечного клапана (*справа*), полученные методом электроспиннинга



Бактериофаги могут быть использованы не только напрямую в качестве бактерицидных агентов: их можно применять в качестве носителей лекарственных препаратов, антител либо терапевтических химических соединений. *На фото* – фаги, несущие на своей поверхности антитела к вирусу осповакцины, атакуют этот вирус. *Атомно-силовая микроскопия. Фото Г. Шевелева и Д. Пышного*

Микробиом как объект и субъект терапии

К настоящему времени хорошо изучены и расшифрованы геномы многих микроорганизмов, поражающих человека. Ведутся исследования и сложных микробиологических сообществ, постоянно связанных с человеком, – *микробиомов*.

Существенный вклад в эту область исследований внесли и отечественные ученые. Так, специалисты ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.) впервые в мире расшифровали геномы вирусов Марбург и натуральной оспы, а ученые ИХБФМ СО РАН – геномы вируса клещевого энцефалита, возбудителей клещевого боррелиоза, распространенных на территории РФ. Также были изучены микробные сообщества, ассоциированные с различными видами опасных для человека клещей.

В развитых странах сегодня активно ведутся работы, направленные на создание средств регуляции микробиома организма человека, в первую очередь его пищеварительного тракта. Как оказалось, от состава микробиома кишечника в огромной степени зависит состояние здоровья. Методы воздействия на микробиом уже существуют: например, обогащение его новыми терапевтическими бактериями, использование

пробиотиков, благоприятствующих размножению полезных бактерий, а также прием *бактериофагов* (вирусов бактерий), избирательно убивающих «вредные» микроорганизмы.

В последнее время работы по созданию средств терапии на основе бактериофагов активизировались во всем мире в связи с проблемой распространения лекарственно-устойчивых бактерий. Россия – одна из немногих стран, где применение бактериофагов в медицине разрешено. В РФ существует промышленное производство препаратов, разработанных еще в советское время, и чтобы получать более эффективные бактериофаги, необходимо их совершенствовать, и эта задача может быть решена методами синтетической биологии.

Решением ее занимаются в ряде научно-исследовательских организаций РФ, в том числе в ИХБФМ СО РАН. В институте охарактеризованы промышленно производимые в РФ фаговые препараты, расшифрованы геномы ряда бактериофагов, а также создана их коллекция, в которую вошли и уникальные вирусы, перспективные для применения в медицине. В клинике института отрабатываются механизмы оказания персонализированной помощи больным, страдающим от бактериальных инфекций, вызванных лекарственно-устойчивыми микроорганизмами. Последние возникают при лечении диабетической стопы,

а также в результате пролежней или послеоперационных осложнений. Разрабатываются и методы коррекции нарушений состава микробиома человека.

Совершенно новые возможности использования вирусов открываются в связи с созданием технологий получения интеллектуальных систем высокоизбирательного действия на определенные клетки. Речь идет об *онколитических вирусах*, способных поражать только опухолевые клетки. В экспериментальном режиме несколько таких вирусов уже применяются в Китае и США. Работы в этой области ведутся и в России, в них принимают участие специалисты из московских и новосибирских научно-исследовательских организаций: ИМБ РАН, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирского государственного университета и ИХБФМ СО РАН.

Быстрое развитие синтетической биологии дает основание ожидать в ближайшие годы важных открытий и появления новых биомедицинских технологий, которые избавят человечество от многих проблем и позволят реально управлять здоровьем, а не только лечить наследственные и «благоприобретенные» заболевания.

Фронт исследований в этой области чрезвычайно широк. Уже сейчас доступные гаджеты представляют собой не просто игрушки, но реально полезные приборы, ежедневно обеспечивающие человека информацией, необходимой для контроля и поддержания здоровья. Новые технологии быстрого углубленного обследования дают возможность предсказать или своевременно обнаружить развитие болезни, а персонализированные препараты на основе «умных» информационных биополимеров позволяют радикально решить проблемы борьбы с инфекционными и генетическими заболеваниями в самом ближайшем будущем.

Мобильное приложение *Welltory*, разработанное с участием ученых и медиков, позволяет на основе вариабельности сердечного ритма и обратной связи с пользователем оценивать текущее самочувствие и получать рекомендации по поддержанию здоровья.
Подробнее на с. 114—121



Литература

Брызгунова О. Е., Лактионов П. П. Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике // *Acta Naturae*. 2015. Т. 7. № 3(26). С. 54–60.

Власов В. В., еще две фамилии и др. Комплементарные здоровью. Прошлое, настоящее и будущее антисмысловых технологий // *НАУКА из первых рук*. 2014. Т. 55. № 1. С. 38–49.

Власов В. В., Воробьев П. Е., Пышный Д. В. и др. Правда о фаготерапии, или памятка врачу и пациенту // *НАУКА из первых рук*. 2016. Т. 70. № 4. С. 58–65.

Власов В. В., Закиян С. М., Медведев С. П. «Редакторы геномов». От «цинковых пальцев» до CRISPR // *НАУКА из первых рук*. 2014. Т. 56. № 2. С. 44–53.

Лифшиц Г. И., Слепухина А. А., Субботовская А. И. и др. Измерение параметров гемостаза: приборная база и перспективы развития // *Медицинская техника*. 2016. Т. 298. № 4. С. 48–52.

Рихтер В. А. Женское молоко – источник потенциального лекарства от рака // *НАУКА из первых рук*. 2013. Т. 52. № 4. С. 26–31.

Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic Acid analogues // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 4(23). P. 116–118.

Nasedkina T. V., Guseva N. A., Gra O. A. et al. Diagnostic microarrays in hematologic oncology: applications of high- and low-density arrays // *Mol Diagn Ther*. 2009. V. 13. N. 2. P. 91–102.

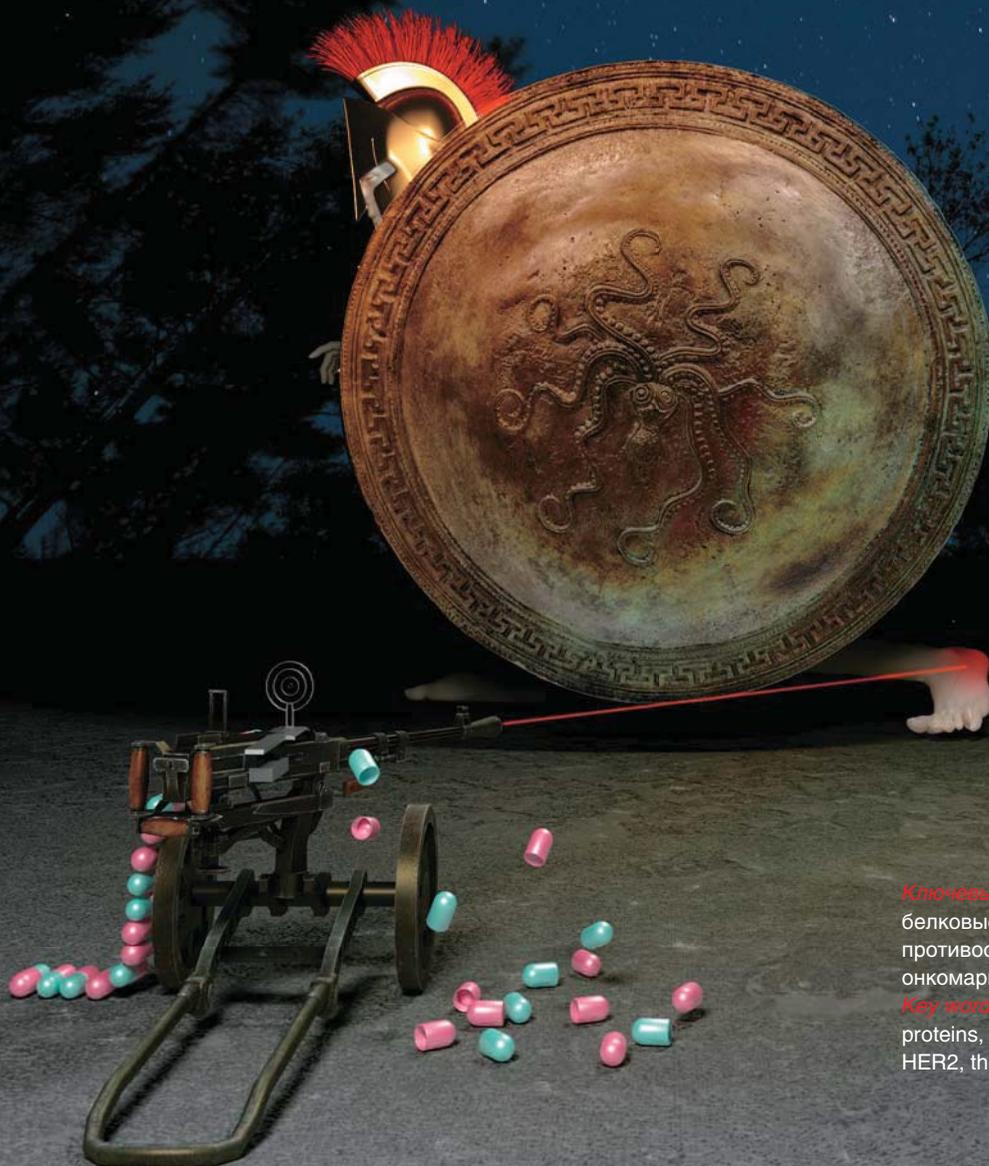
Ponometryova A. A., Morozkin E. S., Rykova E. Y. et al. Dynamic changes in circulating miRNA levels in response to antitumor therapy of lung cancer // *Experimental Lung Research*. 2016. V. 42 N. 2. P. 95–102.

Vorobyeva M., Vorobjev P. and Venyaminova A. Multivalent Aptamers: Versatile Tools for Diagnostic and Therapeutic Applications // *Molecules*. 2016. V. 21 N. 12. P. 1612–1633.



«САМОНАВОДЯЩЕЕСЯ» ЛЕКАРСТВО,

*или Молекулярный
наноконструктор для тераностики*



Ключевые слова: иммуноглобулины, белковые каркасы, скаффолды, противоопухолевые антитела, онкомаркер HER2, тераностика.

Key words: immunoglobulins, scaffold proteins, scaffold, antitumor antibodies, HER2, theranostics

© С. М. Деев, 2017

Герой древнегреческих мифов Ахилл был неуязвим, потому что его мать, богиня Фетида, окунула его после рождения в воды Стикса, реки в царстве мертвых. Она держала будущего воина за пятку, которая осталась его единственным незащищенным местом – именно туда и попала сразившая героя стрела, направленная богом Аполлоном. Эта история является своего рода метафорой для описания одного из самых многообещающих направлений в современной медицине. Сегодня мы можем создавать все новые и новые лекарства, поражающие, к примеру, раковые клетки, но проблема состоит не в том, чтобы создать то или иное соединение: главное, чтобы оно не затронуло весь организм, здоровые органы и ткани, позволив больному пережить само лечение. И эта задача уводит нас в область молекулярной физиологии – к созданию средств, способных прицельно вести поиск ахиллесовой пяты заболевания и избирательно на нее воздействовать



ДЕЕВ Сергей Михайлович – член-корр. РАН, кандидат химических наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Москва). Лауреат премии имени И. И. Мечникова (2014), премии имени М. М. Шемякина (2016). Автор и соавтор более 200 научных работ и 10 патентов

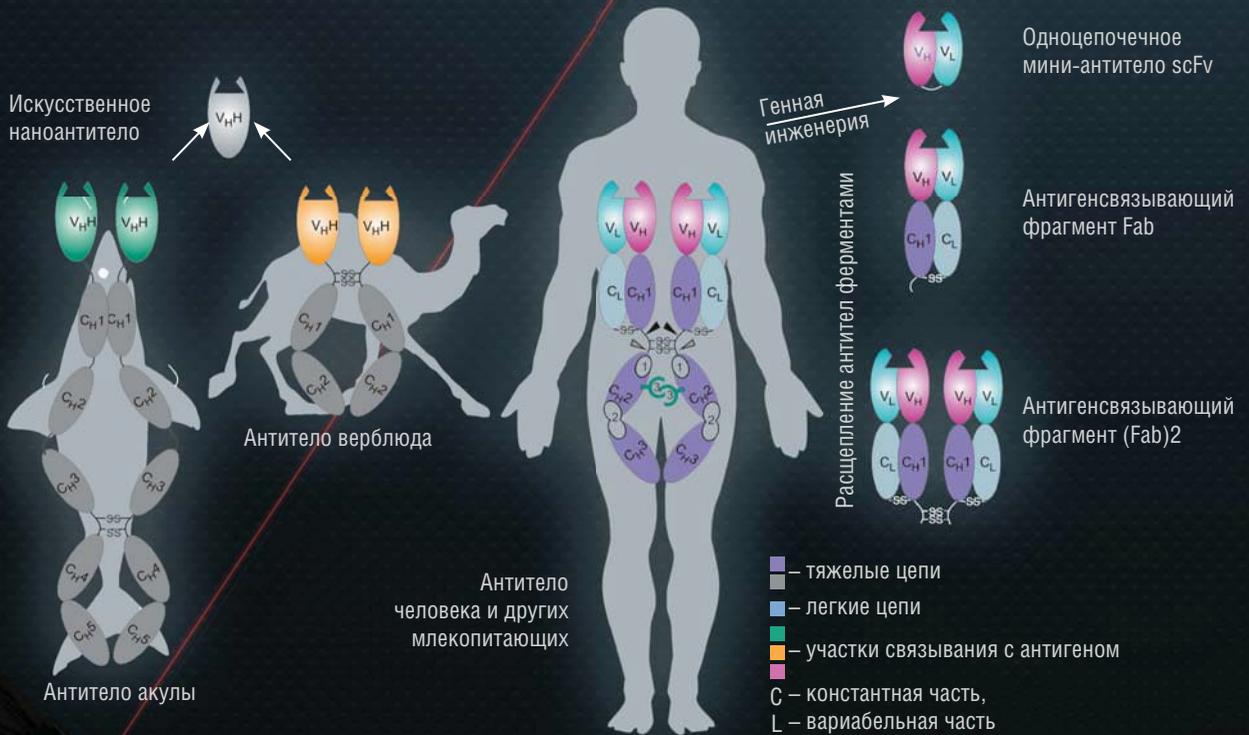
В начале XX в. немецкий иммунолог П. Эрлих, получивший в 1908 г. вместе с российским физиологом И. И. Мечниковым Нобелевскую премию, в своих работах по теории иммунитета впервые сформулировал концепцию «магической пули» – лекарства, которое само бы находило и избирательно поражало очаги заболевания в организме человека. Можно сказать, что эта идея «заимствована» у природы, которая создала «самонаводящиеся» лекарства – белковые *антитела (иммуноглобулины)*, вырабатываемые иммунными клетками в ответ на чужеродное вторжение.

Но замечательная идея «магической пули» начала обретать плоть лишь более полувека спустя, когда было налажено производство так называемых *моноклональных антител*, способных связываться лишь с одним конкретным *антигеном* (чужеродным или опасным веществом, вызывающим иммунный ответ). Такие антитела производили клеточные линии из «гибридов» здоровых и опухолевых иммунных клеток мышей, а для использования в медицине эти белки научились «гуманизировать» с помощью генно-инженерных технологий, заменяя в них фрагменты мышьяных иммуноглобулинов на человеческие.

Сегодня большую долю рынка занимают противоопухолевые препараты. Стоимость выхода на рынок одного лекарственного средства в 1962 г. составляла 4 млн долларов, сейчас – больше 1 млрд. Если бы один человек работал над производством лекарства, он потратил бы 899 лет для того, чтобы сделать одну баночку, т. е. пройти путь от идеи до разработки. Но все это проблемы маркетинговые. Настоящая проблема заключается в устойчивости рака к лекарственным средствам. На рынок выводятся все новые и новые препараты, все более совершенные, но устойчивость онкологических заболеваний к этим препаратам остается серьезнейшей проблемой



Антитела, прицельно связываясь с определенным антигеном на поверхности клетки, могут остановить ее размножение или вызвать апоптоз (программируемое клеточное самоубийство). Антитела также могут спровоцировать атаку иммунных клеток-киллеров. Кроме того, они вызывают каскад реакций системы комплемента – комплекса ферментов, служащих для защиты организма от действия чужеродных агентов. Это приводит к разрушению мембраны клетки и дальнейшему развитию иммунного ответа.
 По: (Acta Naturae, 2009)



Большинство природных антител млекопитающих сходно по строению и содержит по паре идентичных тяжелых и легких цепей. По функциям выделяют два участка: переменный, распознающий антиген клетки-мишени, и константный, отвечающий за развитие иммунного ответа организма. У некоторых животных (верблюд, лама, акула) обнаружены более простые антитела, состоящие только из тяжелых цепей. По: (Acta Naturae, 2009)

Обе эти идеи легли в основу одного из самых бурно развивающихся направлений медицины XXI в. – *тераностики* (от *терапия* и *диагностика*). Таким образом, хотя сам этот термин был впервые использован лишь в 2002 г., мысль сочетать в «одном флаконе» адресующий компонент, который узнает ахиллесову пяту заболевания, и терапевтический оказался далеко не новой, но зато очень многообещающей!

Первые лекарственные препараты на основе моноклональных антител появились на рынке еще в 1986 г., а сегодня в медицине используются около полусотни подобных препаратов, в основном для лечения онкологических заболеваний. Антитела, специфично связываясь с опухолевой клеткой, могут играть двоякую роль. Они либо несут лекарственное соединение или токсин, либо сами служат лекарством, так как способны вызвать «убийство» патологической клетки, привлекая к ней внимание иммунной системы организма.

Однако такие иммуноглобулины дороги в производстве, поскольку их получают в клетках млекопитающих, а не в «высокотехнологичных» клеточных культурах микроорганизмов. При этом на один курс лечения часто требуется не менее дюжины граммов препарата. В результате, к примеру, курс лечения *герцептином* рака молочной железы обойдется примерно в 100 тыс. рублей.

Вторая проблема состоит в том, что любой иммуноглобулин – это крупная молекула, которой непросто пройти через поры кровеносных сосудов, поэтому она будет долго (несколько недель) циркулировать по кровотоку. Это затрудняет адресную доставку лекарств. Большая молекулярная масса мешает таким препаратам проникать внутрь опухолей, поэтому они задерживаются на периферии очага. Кроме того, полноразмерные моноклональные антитела имеют константные участки, отвечающие за взаимодействие с клетками иммунной системы организма, что может спровоцировать дополнительные побочные реакции, когда антитела используются для доставки терапевтических токсических агентов.

Неудивительно, что у ученых появилась идея развить дальше инженерные решения природы. Они начали модифицировать полноразмерные антитела, в том числе дробить на части, создавать мини-антитела и т.п. Параллельно началось интенсивное изучение и создание совершенно новых конструкций на основе природных или искусственно синтезируемых белковых соединений, которые стали называть *скаффолдами* (от англ. «строительные леса»), или *каркасными белками*.

Следующей задачей стало создание многофункциональных соединений, которые одновременно содержали бы как нацеливающую часть, так и диагностический и (или) терапевтический агенты: флуоресцирующие

белки, радиоизотопы, белковые токсины, антибиотики, ферменты и т.п. В идеальном случае подобный комплекс должен иметь еще возможность «включать/выключать» действие агента и тем самым еще более избирательно контролировать его действие.

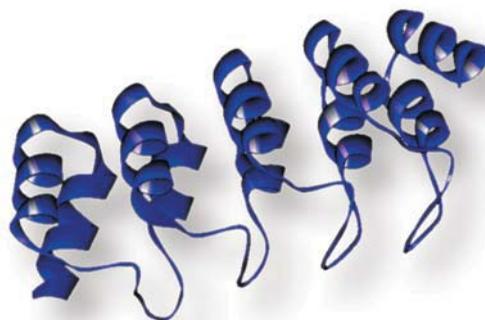
Золотая середина

Вариантов модификации полноразмерного человеческого антитела, состоящего из двух легких и двух тяжелых пептидных цепей, существует множество. Например, мы можем отрезать от молекулы природного иммуноглобулина участок, отвечающий за связывание с конкретным антигеном. Этот фрагмент, в свою очередь, также можно разорвать на части путем ферментативного дробления или с помощью генно-инженерных методов. Скаффолды с еще меньшей молекулярной массой производят только путем белково-инженерного конструирования.

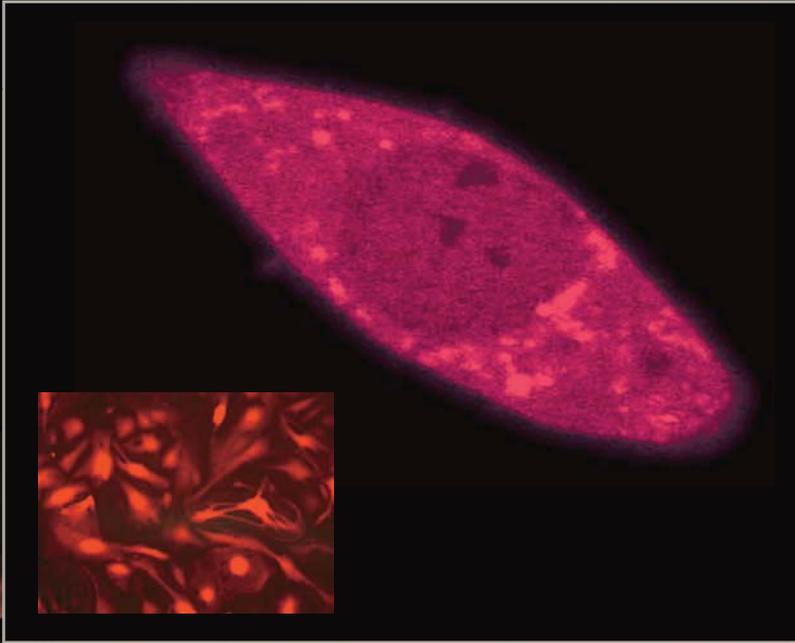
Таким способом можно получить, к примеру, так называемое *одноцепочечное антитело*, состоящее только из антигенсвязывающих переменных участков легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, соединенных гибким пептидным мостиком. Еще более удобные для адресной доставки конструкции могут быть получены по образцу антител верблюда, большая часть иммуноглобулинов которых состоит только из тяжелых цепей, выполняющих все необходимые функции.

Но какие из этих молекулярных конструкций будут работать наиболее эффективно? Здесь нужно учитывать скорость, с которой организм будет освобождаться

Анкириновые повторы



DARPs – это пример искусственного каркасного белка, содержащего видоизменяемые анкириновые повторы, которые служат для связывания с антигеном. По: (Stumpp, Binz, Plückthun, 2003)



В ИБХ РАН созданы флуоресцентные модели клеток аденокарциномы яичника человека, сохранившие онкомаркер на своей поверхности. Эти клетки прививаются подопытным животным, что дает возможность прижизненно проследить развитие болезни. Это значительно облегчает труд экспериментатора, так как в некоторых лабораториях опухоль до сих пор измеряют линейкой, что приводит к большим ошибкам.

Слева – флуоресцентные раковые клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3 cat.

Фото из архива автора.

Внизу – наблюдение роста опухоли у контрольных животных и пролеченных препаратом DARPin29-PE40 (хорошо заметна положительная динамика лечения в первые 30 дней).

Copyright: © 2015 Zdobnova et al. Oncotarget

Продолжительность роста опухоли (дни)

11

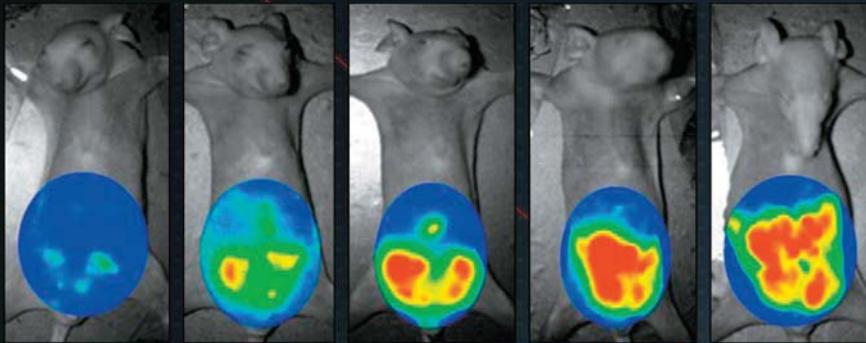
16

23

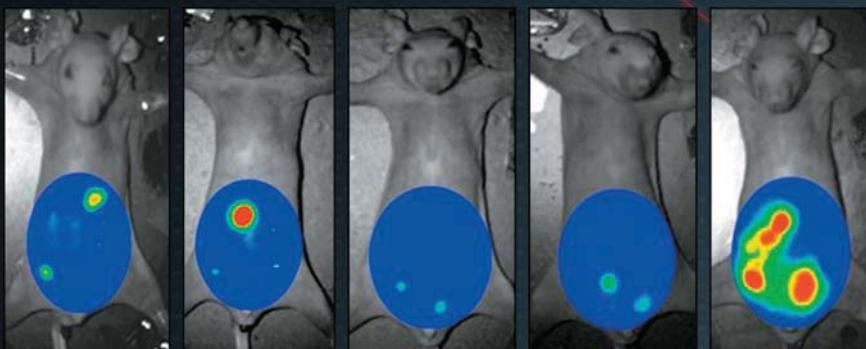
28

35

Контроль



Введение DARPin29-PE40



от всех молекул. Опухолевая ткань характеризуется очень плотными контактами между клетками. И в этом контексте уменьшать размер молекул выгодно, так как они легче проникают в плотные опухоли. Но тут мы сталкиваемся с дилеммой.

В наших почках плазма крови фильтруется через поры диаметром около 6 нм, в результате чего вещества с молекулярной массой меньше 60–65 кДа быстро выводятся через почки. И, следовательно, чем меньше будет размер молекулярных конструкций, тем больше будет нагрузка на почки. С другой стороны, раковая опухоль вся пронизана кровеносными сосудами, которые можно назвать «дырявыми»: они имеют большие (по сравнению с нормальными) поры, что обеспечивает эффективную пассивную доставку небольших молекул. И чем меньше молекула, тем больше вероятность, что она попадет в опухолевую ткань.

В результате биотехнолог, выбирая размер своей молекулярной конструкции, все время должен думать о балансе между эффективностью препарата и его нефротоксичностью. Нужно искать золотую середину.

На сегодняшний день при создании препаратов для тераностики помимо антител различного формата используется целый ряд других природных и искусственных биополимеров: аффибоди, аффитины, финомеры, аптамеры и др.

Примером перспективных каркасных белков служат *дарпины* (DARPin) – небольшие молекулы, в структуре которых есть «заякоривающиеся» аминокислотные повторы, обеспечивающие структурную стабильность, и видоизменяемые аминокислотные остатки, позволяющие модулировать связывание со специфическими мишенями. При этом сила связывания с мишенью у таких молекул порой даже выше, чем у природных антител.

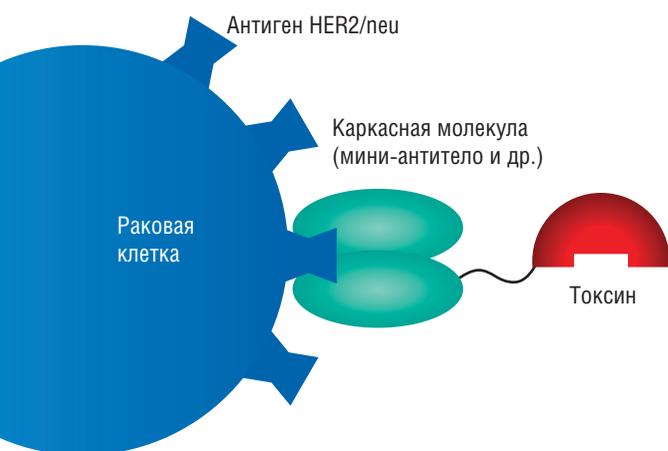


ПРОФЕССОР НА ОБРОКЕ

Я защитил кандидатскую диссертацию по химическим наукам, докторскую – по биологическим, а член-корреспондентом стал по нанобиотехнологии, т. е. в научном плане я мультифункционален.

А началось все с энзимологии, которая занимается изучением активности ферментов. В 1971 г., еще будучи студентом химфака МГУ, я пришел в Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта в лабораторию академика А. Е. Браунштейна, который еще в 1952 г. выдвигался на Нобелевскую премию (думаю, он бы получил ее, если бы не тогдашний «железный занавес»). В то время энзимология была вершиной молекулярной биологии, ведь тогда только начали выдаваться первые Нобелевские премии за открытия ДНК и основ наследственности. ПЦР, геновая инженерия – всего этого и в помине не было.

После защиты кандидатской в 1977 г. я понял, что с уходом великого Браунштейна эта область науки уже не будет такой «горячей». В нашем институте начали заниматься ДНК, и в 25 лет я полностью сменил направление исследований.



В ИБХ РАН создан ряд иммунотоксинов направленного действия против злокачественных новообразований, несущих онкомаркер HER2/neu, наличие которого предопределяет неблагоприятный прогноз для пациента

Но для биотехнологии главное – это экономические показатели. Если с одного литра культуры кишечной палочки мы получаем ~5 мг «укороченных» иммуноглобулинов, то в случае дарпинов – в 30–40 раз больше! Кроме того, дарпины очень устойчивы – их можно чуть ли не кипятить. И даже если присоединить к ним что-то достаточно объемное (токсин, наночастицы), то размер конструкции все равно останется оптимальным для кровотока.

У всех известных на сегодня альтернативных каркасных белков разные структуры и молекулярный вес. Но в целом можно сказать, что они слишком велики по сравнению с малыми пептидами и слишком малы по сравнению с обычными антителами. Поэтому мы не можем напрямую транслировать на них уже имеющиеся знания о распределении или фармакокинетике других белковых молекул. Нужно проверять все: нельзя механистически заменить иммуноглобулин на дарпин и ожидать, что это будет работать.

Токсин как лекарство

Большое число исследований в тераностике сегодня посвящено созданию бифункциональных соединений на основе противоопухолевых антител

и мощных токсинов различной природы для воздействия на клетки-мишени. Почти половина препаратов, проходящих сейчас клинические испытания, являются такими *иммунотоксинами*.

Еще в 1990-х гг. начались попытки использовать для этой цели ферменты *рибонуклеазы* (РНКазы), которые катализируют расщепление рибонуклеиновых кислот (РНК), исполняющих в клетке ряд важнейших функций, начиная с участия в синтезе белка. Эти ферменты привлекают исследователей своей доступностью, отсутствием мутагенного эффекта и низкой побочной токсичностью для организма. В нашей стране коллектив сотрудников под руководством академика А. А. Макарова выполнил целый ряд исследований, доказавших перспективность использования рибонуклеаз для противоопухолевой терапии.

Для создания нашего иммунотоксина мы использовали *барназу* – бактериальную рибонуклеазу, которая не ингибируется в клетках человека. Конструкция, содержащая две молекулы барназы и мини-антитело, специфичное к опухолевому маркеру HER2, вызывала гибель раковых клеток с таким маркером *in vitro* и эффективно подавляла рост опухоли *in vivo*. При этом цитотоксический эффект препарата с антителом оказался примерно на три порядка (!) выше, чем индивидуальной барназы.

Чемпионом по токсичности на сегодняшний день считается *псевдомонадный токсин А*, выделяемый синегнойной палочкой: чтобы убить клетку, достаточно 2–3 молекул этого белка. Однако такой токсин убивает без разбора, поэтому при создании препарата один из участков этого белка заменяется на адресующий модуль.

В созданных нами двух иммунотоксинах в качестве направляющего модуля выступают одноцепочечное мини-антитело и дарпин. И в том и в другом случае были получены очень хорошие терапевтические результаты: токсин убивал только раковые клетки и действовал в очень низких концентрациях. Эффективность токсина была показана не только на клеточных культурах, но и в опытах на лабораторных животных.

Да будет свет!

В начале нового века были созданы флуоресцентные белки, способные при облучении светом производить активные формы кислорода, губительно действующие на клетки, в том числе опухолевые. Первым примером стал *Killer Red* – мутантный белок гидроидной медузы, полученный в Институте биоорганической химии РАН (Москва). Присоединив к этому белку специфическое противораковое мини-антитело, мы получили первый полностью генетически кодируемый *иммунофототоксин*, который можно производить генно-инженерным способом.

Еще один удивительный флуоресцентный белок – *мини-SOG*, модифицированный белок растения из семейства капустных. С этим фототоксином мы также создали две конструкции, где направляющими модулями служили либо одноцепочечное мини-антитело, либо дарпин. Однако при проверке токсического эффекта этих препаратов обнаружились странные факты: более крупная конструкция с мини-антителом оказалась почти в 30 раз эффективнее, чем с небольшим дарпином. Это шло вразрез с устоявшимися канонами фотодинамической терапии, согласно которой лучше всего работают фототоксины небольшого размера, которые легко проникают внутрь клетки и в клеточное ядро.

Дальнейшие исследования показали, что конструкция с мини-антителом действительно эффективнее, поскольку она дольше задерживается на поверхности мишени и буквально «прожигает» дыры в клеточной мембране, вызывая ее разрушение. А молекула с дарпином сразу попадает в цитоплазму, где имеется много защитных механизмов, восстанавливающих повреждение. Вот такая разная функциональная активность при сходстве структуры!

Мини-SOG в десять раз активнее *Killer Red*, но использовать его в медицинских целях непросто. Для возбуждения этого белка требуется синий свет, который плохо проникает сквозь кожу и другие ткани. Проблема была решена радикально: источник света был доставлен непосредственно в то место, где должен работать фототоксин. Для этого была создана тандемная генно-инженерная конструкция, обеспечивающая одновременный биосинтез мини-SOG и фермента *люциферазы NanoLuc*, которая при добавлении специфического субстрата

запускает процесс биолюминесценции, и нужное излучение генерируется рядом или непосредственно внутри клетки-мишени.

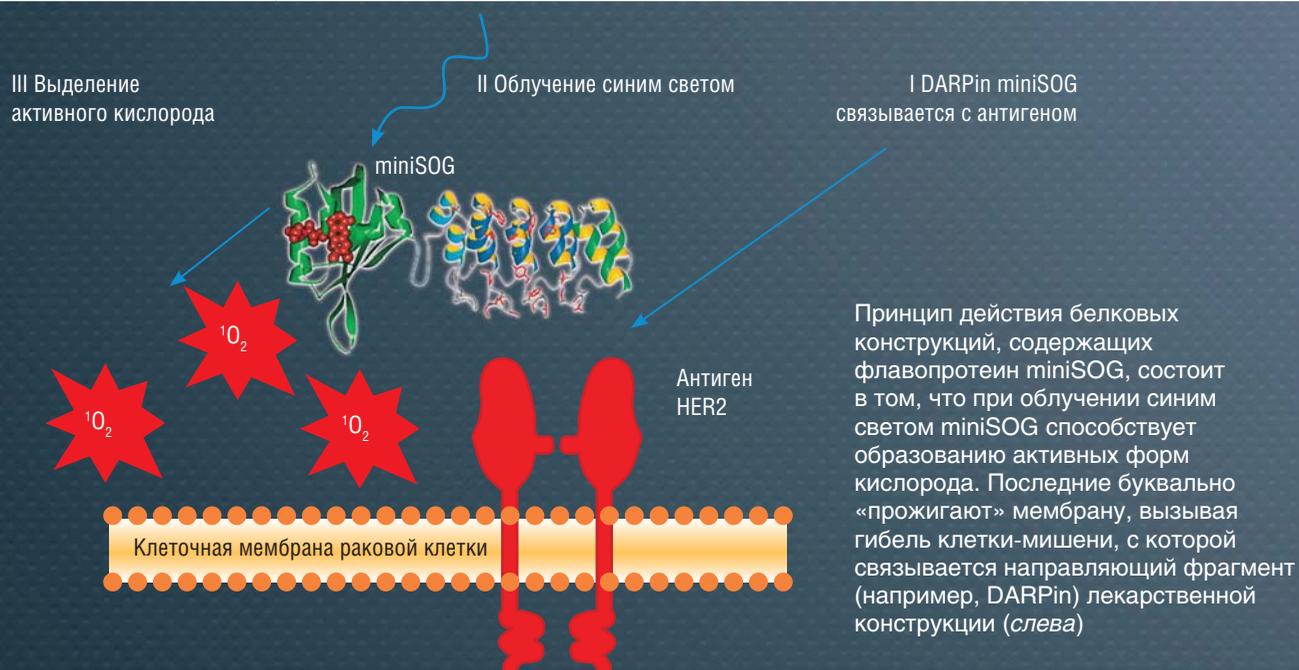
При облучении синим светом выделяют активные формы кислорода и всем знакомый *рибофлавин* (витамин В2), и его производные. Если этим витамином насытить опухолевые клетки (а у них есть соответствующий рецептор) и затем облучить, то можно добиться их деградации. Но сделать это возможно опять же либо на открытом операционном поле, либо в «пробирке».

Для этой проблемы найдено нестандартное решение. Красный свет, в отличие от синего, проникает очень глубоко. И есть очень интересные неорганические фотолюминесцентные наночастицы с хорошей биосовместимостью – *нанофосфобы*, которые при облучении красным светом начинают переизлучать в синей части спектра. Остается лишь доставить эти наночастицы к очагу поражения, что и было сделано вместе с профессором А. В. Звягиным и группой российских ученых под руководством академика В. Я. Панченко.

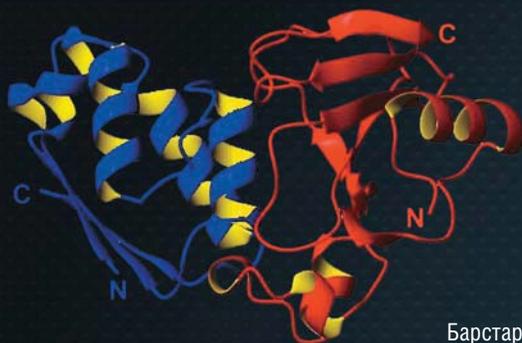
Молекулярное ЛЕГО

Как известно, будущее – за персонализированной медициной. И в этом смысле очень важно, чтобы мы научились «собирать» нужные для конкретного пациента молекулярные тераностические конструкции непосредственно перед использованием из готовых блоков. Другими словами, нужна универсализация.

Таким универсальным каркасным модулем может служить наша любимая пара белков «*барназа-барстар*». Уже упомянутая барназа является



Барназа



Барстар

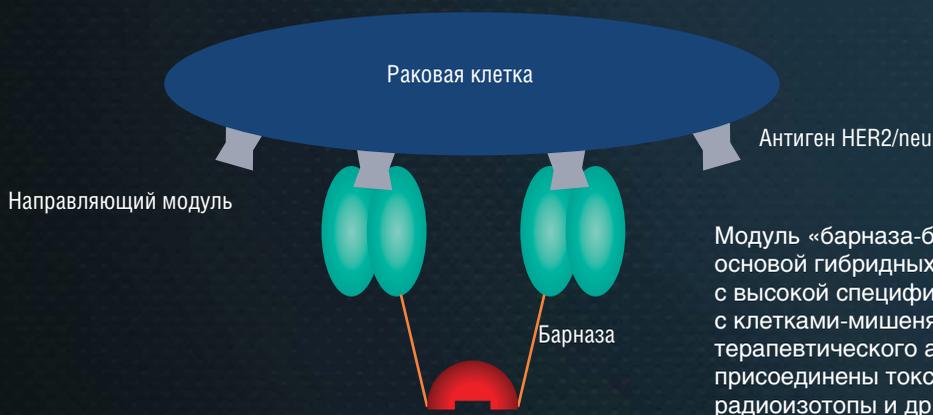
Универсальный структурный модуль «барназа-барстар» представляет собой комплекс из бактериальных белков: фермента барназы и его природного ингибитора барстара. Одна молекула барназы связывается строго с одной молекулой барстара. N- и C-концевые участки белков остаются свободными и удобными для модификации

бактериальным ферментом, а барстар – ее природным ингибитором. Эти небольшие, хорошо растворимые и устойчивые белки образуют при простом смешивании удивительно прочный комплекс путем самосборки. При этом концы обоих белков остаются свободными, и к ним можно присоединить все, что нужно: от адресующего мини-антитела до токсинов. Важными преимуществами такого модуля являются точное (строго 1:1) соотношение компонентов, которое в норме не присутствует в клетке высших организмов, и исключительно высокая специфичность взаимодействия, что исключает проблему образования «неправильных» пар.

Вариантов использования этого комплекса множество. Например, присоединив адресующую часть антитела к двум молекулам барназы, а к барстара – экзотоксин, мы получили хорошо работающую

терапевтическую конструкцию против опухолевых клеток с маркером HER2.

Система «барназа-барстар» предоставляет возможность двухстадийной доставки агента к патологическому очагу. Например, для визуализации опухоли сначала вводят препарат на основе барстара, соединенного с мини-антителом, распознающим раковый поверхностный антиген HER2/neu. Затем вводится барназа, к которой присоединен флуоресцентный белок EGFP. Самосборка модуля «барназа-барстар» происходит только на поверхности раковых клеток, что позволяет «увидеть» патогенный очаг. Такую отдельную доставку можно использовать и в случае применения радиоизотопов и других высокотоксичных соединений, чтобы снизить риск поражения здоровых тканей.



Модуль «барназа-барстар» может служить основой гибридных структур для тераностики с высокой специфичностью взаимодействия с клетками-мишенями. В качестве терапевтического агента к ним могут быть присоединены токсины различной природы, радиоизотопы и др.



Тогда появились работы японского молекулярного биолога С. Тонегавы, который в 1987 г. получил Нобелевскую премию за открытие механизма перегруппировки генов, кодирующих иммуноглобулины. Я увлекся генетикой иммунного ответа, и моя докторская, защищенная в 1990 г., уже называлась «Гены иммуноглобулинов. Структура и перегруппировки». Отмечу, что нам удалось в некоторых деталях уточнить механизм перегруппировки Тонегавы. Конечно, это «песчинка», но все же свой вклад в понимание генного механизма, отвечающего за разнообразие антител, мы внесли.

1990-е – это не только тяжелое голодное время для нашей страны. В это время продолжала бурно развиваться генная инженерия. От этой «горячей области» ответвилось технологическое направление – «инжиниринг антител», которое также стало активно развиваться. Здесь возникло два направления, в какой-то степени конкурировавших между собой: создание полноразмерных антител, которые сейчас уже прочно вышли на рынок, и создание мини-антител.

У меня появилась крохотная лаборатория, где сначала мы занялись полноразмерными молекулами иммуноглобулинов. С помощью методов генной инженерии нам удалось поменять изотип этих молекул, определяемый структурой тяжелых цепей. Но полноразмерные иммуноглобулины дороги, и в то время наладить такое производство было нереально. Поэтому мы начали заниматься малыми молекулами – это был сугубо практический выбор (в последние годы в мире это направление стало активно развиваться, и я уверен, что за ним – будущее).

Мой сын рос, он играл в LEGO, и меня осенила мысль: хорошо бы научиться создавать нужную конструкцию из блоков, заранее синтезированных. Ведь это проще и быстрее – работать с готовыми «кирпичиками»: один кирпичик – направляющий, второй – терапевтический. В качестве платформы я выбрал две небольшие молекулы, образующие прочный комплекс: «барназу» и «барстар».

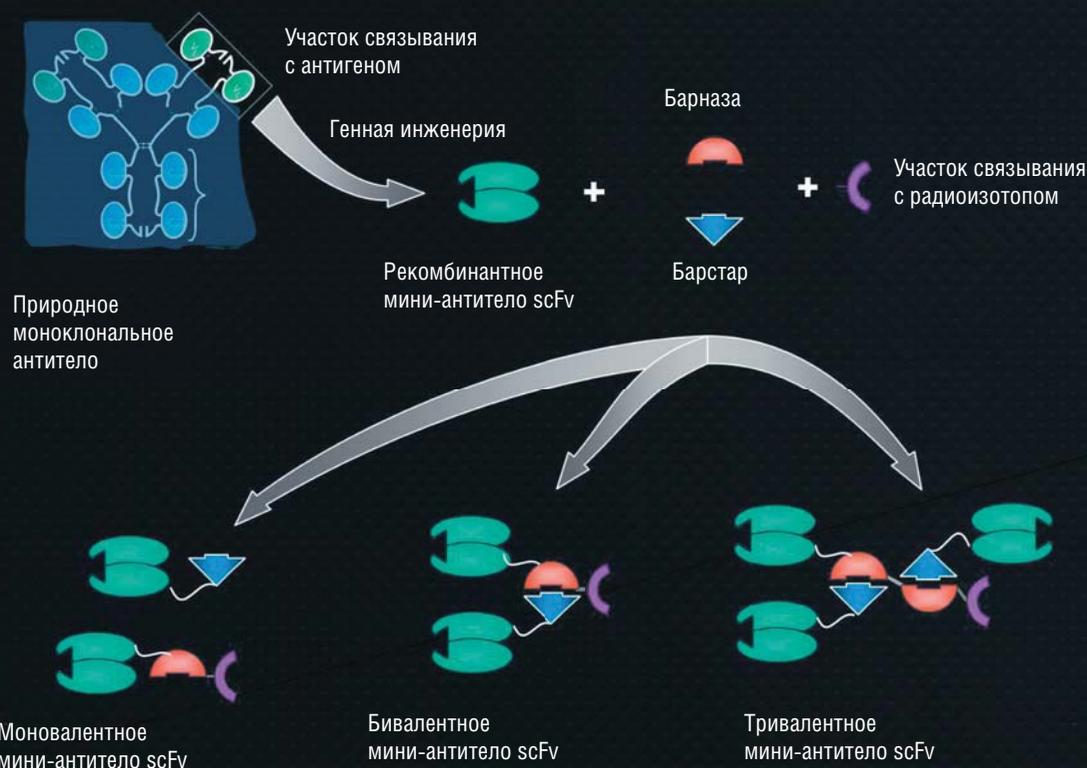
Идея хорошая, но вот возможностей для ее реализации не было никаких. В конце 1990-х положение в науке стало совсем тяжелым. Правдами и неправдами я попал на конференцию в Сан-Диего по инженерии антител. Там выбрал из всех, кто занимался подобными вещами, профессора А. Плюктуну, который, на мой взгляд, был «лучшим из лучших». Подошел к нему и предложил себя для совместной работы в любом качестве (к тому времени на родине я уже был профессором).

Сам Плюктун занимался технологией «лейциновых зипперов» – аминокислотных «застежек». Небезынтересная, хотя и совсем другая история, как он придумал эти «застежки». Насколько я помню из его рассказов, в основе была аспирантская ошибка при конструировании ДНК, которая



привела к тому, что получились другие аминокислоты, сложившиеся в «застежку». Девять из десяти ученых прошли бы мимо, но великий Плюктун понял, что это можно использовать, и развил технологию «зипперов», которой и предложил мне первоначально заниматься. Но я хотел развивать собственную идею сборки на основе пары «барназа–барстар».

Когда академик В. А. Энгельгардт основал свой институт, отечественной «молекулярки» у нас не было. Энгельгардт говорил: «Берите любую работу из американского PNAS и повторите ее, тогда можете получить собственную лабораторию». Его подход – великая вещь: он позволил заложить основу института и добиться успеха (вторая его не менее успешная идея состояла в том, что за одним столом, но не в одном лице, должны работать химик, физик и биолог). Да, для начала необходимо использовать чужой опыт, но потом – потом нужно начинать что-то свое!

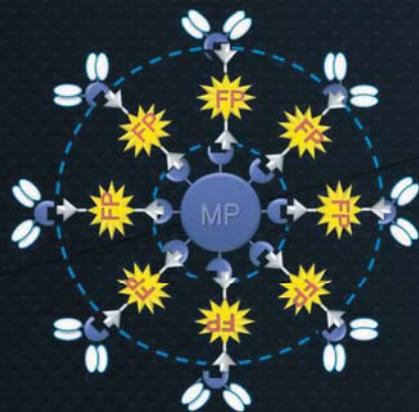


Пример конструирования мини-антител для адресной доставки радиоизотопов с разной эффективностью связывания с клеткой-мишенью и разным молекулярным весом

Как барназу, так и барстар можно ковалентно привязать не только к белкам, но и к коллоидным структурам. Силы взаимодействия барназы и барстара достаточно, чтобы объединять и удерживать в едином комплексе различные микро- и наночастицы органического и неорганического происхождения («квантовые точки», магнитные наночастицы, коллоидное золото, нанополымеры, нанополыфосфаты, полимерные наночастицы). Поверхность самих наночастиц с чрезвычайно большой удельной площадью может служить «площадкой» для связывания с различными молекулами, что позволяет оснащать их дополнительными функциональными модулями, создавая суперструктуры. Это не только расширяет возможности молекулярного конструирования, но и позволяет направленно влиять на клетки-мишени с помощью внешнего (теплового, оптического, электромагнитного, акустического) воздействия.

Большая часть разработок, о которых шла речь выше, – это потенциальные лекарства будущего. Однако некоторые из них уже прошли доклинические испытания, в том числе уже упомянутый иммунотоксин против рака молочной железы, конкретнее, против широко распространенного и одного из самых злокачественных видов рака, характеризующегося онкомаркером HER2.

Имунотоксин с помощью мини-антитела распознает клетки, несущие HER2, а фермент барназа подавляет их. Уникальность этого препарата в том, что у него есть возможность отмены цитотоксического действия. Для этого достаточно лишь добавить барстар – природный ингибитор барназы, и препарат полностью теряет свою цитотоксическую активность.



 – барназа

 – барстар

 – бивалентное мини-антитело с барназой

FP – флуоресцентные частицы

MP – магнитная наночастица



Пример эффективности молекулярных конструкций на основе наночастиц: меченные трифункциональными нанобиоконъюгатами раковые клетки выстраиваются в магнитном поле по заданному контуру. Слева – схема самосборки такого биоконъюгата на основе модуля «барназа-барстар». Copyright: © 2010 Nikitin et al. PNAS

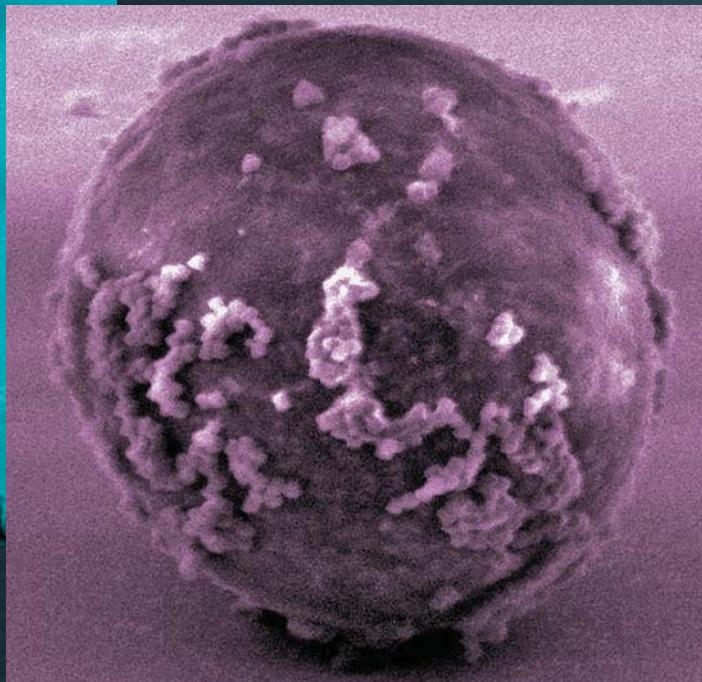
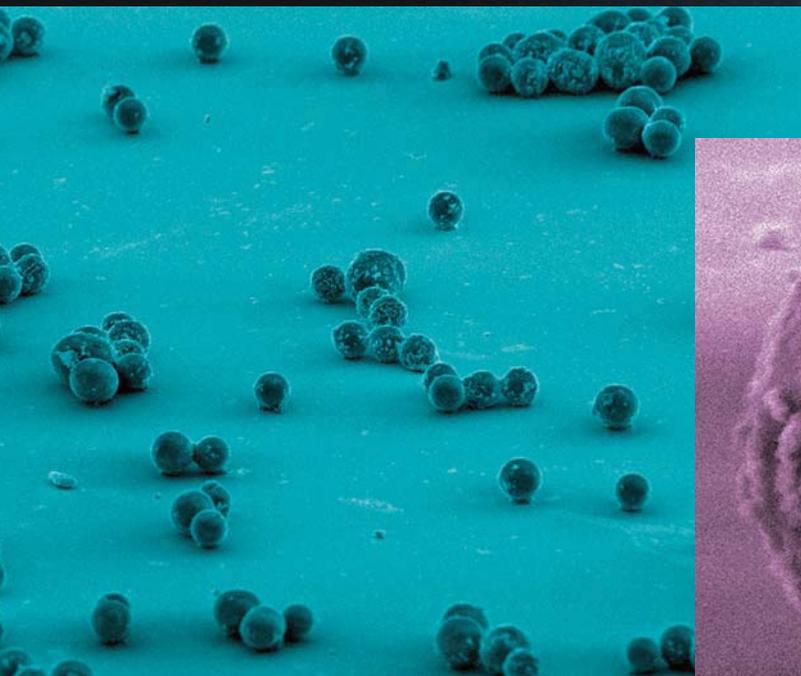
Для испытаний этого лекарства мы в свое время получили грант от Минпромторга РФ. А потом наступил 2008 г., экономический кризис... Сейчас кто-то должен подхватить этот проект и продвигать его дальше. Нужны клинические испытания, а это уже совсем другие деньги.

У нас неоднократно бывали эмиссары из-за границы, предлагали купить наши разработки. Это были, как правило, мелкие коммивояжеры, которые стремятся за относительно небольшие деньги купить патент, а потом перепродать его крупной фирме. Но последние часто покупают патенты, чтобы положить их «под сукно». И таких патентов, уверен, много. Большие фирмы тратят сотни миллионов на создание лекарства, в том числе и на маркетинг. Например, вхождение того же герцептина в клиническую практику обошлось в десятки миллионов долларов. Это большие деньги,

и если компания вложила их, то она настроена окупить их, пусть даже у ученых появятся более эффективные разработки.

Но дело не только в этом. Революционных вещей в области онкологии не бывает: вылечить всех от всего и навсегда невозможно. Мы можем делать препарат на 10% лучше, на 70%... Но вылечить? Никто не обманывает, но есть правда большая и маленькая.

Основная проблема рака в том, что его часто не удается вылечить «насовсем». Нередко мы видим, что опухоль исчезает, но через несколько месяцев вновь появляется. Механизмов тут может быть несколько. Академик Г.И. Абелев как-то сравнил рак с гоночным внедорожником: разгоняется быстро и едет, куда хочет. Опухолевые клетки быстро делятся и адаптируются. Например, они могут сбрасывать или «прятать» свои онкомаркеры (как самолеты сбрасывают алюминиевую



Сконструированные в ИБХ РАН с помощью модуля «барназа-барстар» наноструктуры из магнитных и флуоресцентных частиц. *Электронная микроскопия. Фото из архива автора*

фольгу, чтобы радары их не видели). А ведь наше HER2-антитело связывается в первую очередь именно с такими маркерами.

Возможно, все дело в стволовых раковых клетках, которые дают поколение новых патологических клеток. Мы этой областью пока не занимаемся, но, возможно, именно там в будущем произойдет революция. Если мы сможем убивать не только саму опухоль, но и потенциальные раковые клетки – вот это будет прорыв. Все остальное, в том числе то, чем мы занимаемся, это эволюция.

Вот замедлить процесс мы можем, и тут главный вопрос: на какой стадии, каковы факторы риска? Говорят, что самая лучшая терапия – ранняя диагностика. На Западе терапия рака молочной железы на ранней стадии – это залог 98% успеха лечения. Я уверен, что чем раньше начать использовать наш препарат, тем выше будут шансы изжить рак, получить если не полное выздоровление, то хотя бы длительную ремиссию.

Литература

Гребеник Е.А., Костюк А.Б., Деев С.М. Наноразмерные антистокеровые фосфоры и гибридные конструкции на их основе для медицинского применения // *Успехи химии*. 2016. Т. 85 № 12. С. 1277–1296.

Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 39–50.

Поляновский О.Л., Лебедеенко Е.Н., Деев С.М. ERBBонкоены – мишени моноклональных антител // *Биохимия*. 2012, Т. 77. № 3. С. 289–311.

Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N. et al. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module // *Nature Biotechnology*. 2003. V. 21. N. 12. P. 1486–1492

Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M. et al. Biocomputing based on particle disassembly // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. N. 9. P. 716–722.

Stumpp M.T., Binz H.K., Plückthun A. A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins // *FEBS Letters*. 2003. V. 539. N. 1-3. P. 2–6.

Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., et al. A Novel Far-Red Fluorescent Xenograft Model of Ovarian Carcinoma For Preclinical Evaluation of HER2-targeted Immunotoxins // *Oncotarget*. 2015. V. 31. N. 6. P. 30919–30928.

С. М. Деев: «Это ужасно, когда люди, больные раком, подходят и спрашивают, можем ли мы им помочь. Я не знаю, что им ответить... Я ведь ученый, а не врач. Я не имею права лечить»

Конечно, можно взять любую существующую успешную технологию и развить ее, создать на этой основе новый (аналогичный) вариант лекарства для разных форм рака, и это, скорее всего, будет обречено на успех. Но это не будет чем-то уникальным, это не будет «впервые».

...В результате Плюктун все-таки пригласил меня в свою лабораторию и предложил студенческую стипендию, чтобы я смог поработать в Швейцарии. За это я ему буду всегда благодарен. И это касается не только возможности поработать в одной из лучших и прекрасно оснащенных лабораторий мира, но и многих интереснейших и плодотворных обсуждений, которые помогли мне сформировать адекватный взгляд на проблему биоинженерии и на свое место в этой области. Кстати, уместно заметить, что и новая прорывная технология дарпинов была создана и успешно развивается именно в лаборатории профессора Плюктун. Он действительно и без всякого преувеличения «классик» белковой инженерии.

Но вернемся в конец 1990-х гг. Первое время я жил в общежитии евангелической молодежи «Оазис». Там было неплохо, но так холодно, что втайне пришлось купить обогреватель. Душем в коридоре нельзя было пользоваться с 10 вечера до 6 утра, чтобы не будить других постояльцев. Из лаборатории я возвращался как раз в это запретное время и зимними ночами, чтобы не было слышно, тихо мылся под тонкой струйкой горячей воды, чтобы хоть как-то согреться. Сейчас-то это все кажется смешным и милым... В первые три месяца работы у меня ничего не получалось. Стипендию продлили еще на три месяца – и дело пошло! Я стал делить свою жизнь между Москвой и Цюрихом. Начал получать уже не 1600 швейцарских франков, а 10 тысяч. Параллельно с женой и сыном строил дом в Москве, освоил строительные специальности и даже сварку, что считаю не меньшим достижением, чем профессорское звание. Было нелегко. В какой-то момент я осознал, что, как раньше крестьяне ездили на оброк в город, так и я езжу



на заработки в Швейцарию. Конечно, условия изменились. Я стал почетным приглашенным профессором, у меня был безвизовый въезд, а вместо общежития «профессора Сергея» ждала специально арендованная комфортабельная квартира...

Вся эта работа закончилась статьей в *Nature Biotechnology* (2003), а мои поездки прекратились по семейным обстоятельствам. Идея универсальной платформы «барназа-барстар» сработала и имеет русско-швейцарское гражданство, подтвержденное общим патентом. Следующая статья вышла в *Nature Nanotechnology* спустя 11 лет. К тому времени появились талантливые сотрудники, и эта работа имела полностью отечественную «прописку». Но это уже другая история. Между этими датами было опубликовано около двух десятков статей как из нашей лаборатории, так и других авторов, которые стали развивать эту тему

Как замедление работы жизненно важных ферментов поможет в создании лекарств от РАКА

Системы репарации, если в их работе нет дефектов, устраняют практически любое повреждение ДНК.

Разные белковые ансамбли специализируются на проведении «ремонта» ДНК определенного типа. Однако при лечении онкологических заболеваний ферментам репарации нужно, наоборот, затруднить работу, чтобы они не мешали уничтожению раковых клеток.

Для этого ученые разрабатывают лекарства – ингибиторы ферментов репарации и репликации, и некоторые из них уже применяются в клинической практике. Например, это препараты на основе производных камптотецина, стабилизирующие связь с ДНК фермента топоизомеразы I. В норме этот фермент периодически обратимо связывается с ДНК, которая в этом связанном состоянии содержит разрыв цепи. Соединения камптотецина взаимодействуют одновременно с белком и с ДНК и не дают им «расстаться», и со временем количество «дырок» в ДНК возрастает настолько, что клетка гибнет. Но выяснилось, что стабилизацию ДНК с ферментом способен снимать еще один фермент – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, и ученые были вынуждены заняться поиском и его ингибиторов. Недавно этот поиск вошел в стадию экспериментов на животных, и результатами уже заинтересовались специалисты, занимающиеся клиническими испытаниями...

Ключевые слова: ферменты репарации, тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, лечение рака
Key words: repair enzymes, tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, cancer treatment

ДНК в организме живых существ постоянно подвергается разнообразным воздействиям физической и химической природы, в результате чего в ней возникают повреждения. Объемные повреждения ДНК вызывают ультрафиолет и мутагены окружающей среды, рентгеновское излучение – двойные разрывы ДНК. Наиболее серьезным типом повреждения структуры ДНК считаются модификации азотистых оснований и разрывы цепей ДНК, вызванные эндогенными окислителями, поскольку это происходит не под действием внешних факторов, а в результате обменных процессов, идущих в самом организме. И, наконец, случаются ошибки репликации, т.е. удвоения ДНК, когда в синтезирующуюся цепь нуклеиновой кислоты встраивается неправильное основание.

Но есть и механизмы «ремонта», или *репарации*, которые эти повреждения чинят. Существует несколько систем репарации, представляющих собой белковые ансамбли, специализирующиеся на проведении определенного типа «ремонта» ДНК.

Как правило, система репарации чрезвычайно эффективна и удаляет практически любое повреждение ДНК – но только если в ее работе нет дефектов. Если они есть, это приводит к различным заболеваниям, среди которых бич современного человечества – онкологические заболевания. Безусловно, с неэффективной работой систем репарации связан и процесс старения.

Но есть другая сторона этого вопроса: при лечении онкологических заболеваний нужно, напротив, затруднить работу системам репарации. Химиотерапия и ионизирующая радиация способны убивать раковые клетки, разрушая целостность структуры их ДНК. К сожалению, системы репарации активно работают и в клетках опухоли, мешая ее уничтожению.

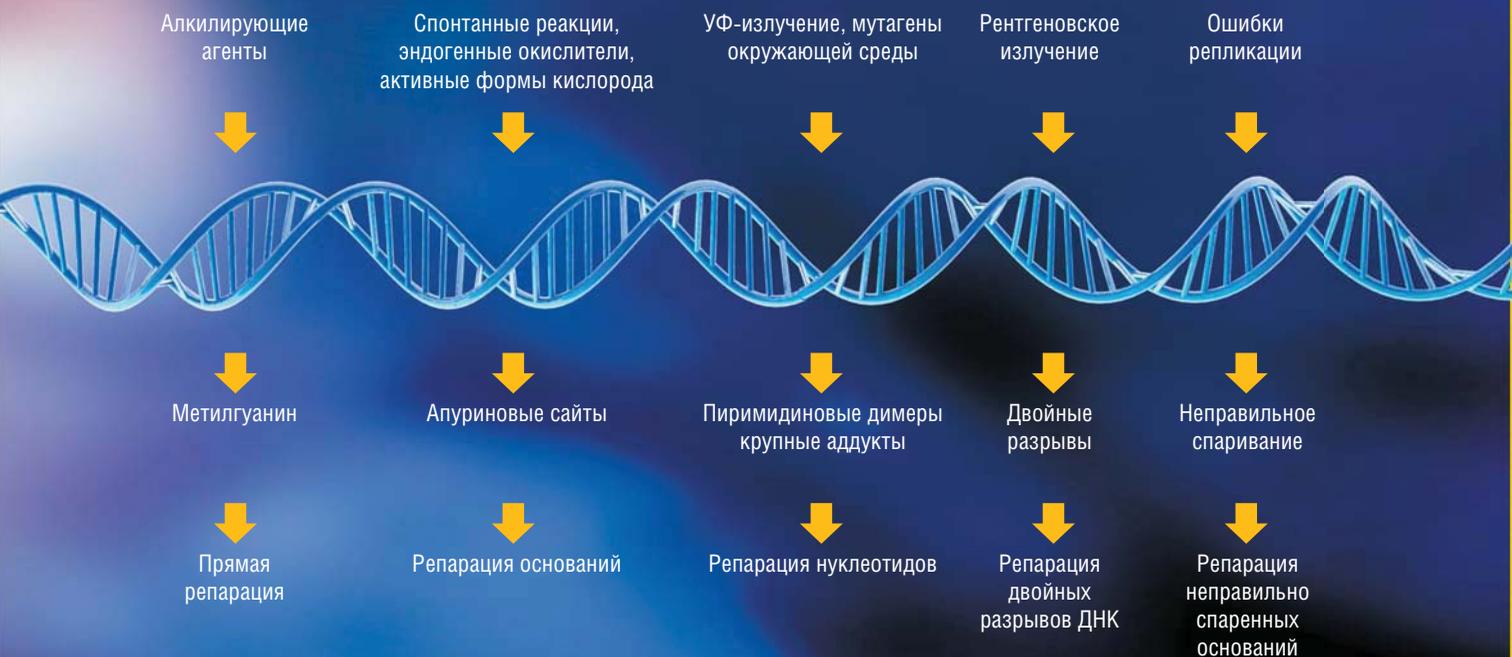


ЛАВРИК Ольга Ивановна – член-корр. РАН, доктор химических наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) и совместной лабораторией защитных репарационных систем Новосибирского государственного университета, профессор кафедры молекулярной биологии ФЕН НГУ. Автор и соавтор более 360 научных работ, в том числе 12 монографий и учебников, а также 9 патентов

Еще одна область, где нужно ингибировать репарацию ДНК, – это редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas, позволяющее исправлять генетические нарушения или вносить изменения в структуру ДНК. Основой системы является комплекс из белка Cas9, способного разрезать нить ДНК, и *гидовой* РНК, которая может распознавать и связываться с определенным участком ДНК-мишени. Но системы репарации при этом стремятся репарировать создаваемый разрыв в молекуле ДНК, чем могут существенно снизить эффективность этой процедуры.

Какие ферменты ингибировать?

Как для лечения онкозаболеваний, так и эффективного использования геномного редактирования необходимы ингибиторы систем репарации. Над их созданием в мире работает много лабораторий, но нельзя сказать, что очень успешно. Однако позитивные примеры



Повреждения ДНК могут вызываться разными агентами. Алкилирующие соединения химически присоединяют к ДНК метильную группу, что вызывает нарушение ее структуры и стабильности. Повреждают структуру ДНК окислительные процессы, ультрафиолет и рентгеновское излучение, мутагены окружающей среды. И, наконец, случаются ошибки репликации. Система репарации способна все это исправить

есть, и ряд препаратов уже применяется в клинической практике. Например, при лечении *рака прямой кишки* и *мелкоклеточного рака легких* используются ингибиторы фермента *топоизомеразы I*, препарата на основе производных *камптотецина*. При ряде других онкологических заболеваний применяют *этопозид* – ингибитор *топоизомеразы II*. Недавно было разрешено использовать ингибиторы фермента *поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1)*: *олапариб (линпарза)*, *рукапариб (рубрака)* и *нирапариб (зеджула)*.

PARP1 был открыт еще в 1960-е гг. Этот фермент является универсальным регулятором сразу нескольких механизмов репарации ДНК. Он распознает разрывы ДНК, присоединяется к ним и синтезирует полимер поли(АДФ-рибозу), которая ковалентно связывается с белками, включая сам PARP1. Это приводит к ингибированию взаимодействий белков с ДНК, т.е. к деконденсации хроматина, что облегчает доступ к поврежденному участку ДНК другим ферментам репарации.

В свете этого идея ингибировать активность PARP1 (по сути, сразу несколько репарационных механизмов) на первый взгляд кажется очень привлекательной. Но этот фермент многофункционален и вовлечен во множество ключевых клеточных процессов, таких

как *транскрипция* (переписывание информации с ДНК на РНК). Подавляя репарационную активность фермента, мы одновременно подавляем другие его функции. Поэтому препараты-ингибиторы PARP1 очень токсичны и применяются с большой осторожностью. Олапариб, к примеру, используют для лечения рака груди и яичников только у пациенток с мутациями в генах BRCA1/2 и только в критических случаях.

В нашей лаборатории хотя и ведутся работы в области поиска ингибиторов PARP1, но одновременно мы ищем более специфические мишени, чтобы создать менее токсичные и более щадящие организм лекарства.

Одна из таких мишеней – фермент *тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1)*. У него тоже несколько функций, но этот белок менее разносторонний по сравнению с PARP1. Его основная работа состоит в том, чтобы удалять с ДНК остаток фермента *топоизомеразы I* (вообще, TDP1 способна удалять любые заместители с 3'-конца цепи ДНК).

Топоизомеразы I в рамках динамичного поддержания определенной конформации двойной спирали ДНК вносят в цепь ДНК разрыв, ковалентно соединяясь с одним из его концов, а потом происходит восстановление цепи. Если связанное состояние топоизо-



меразы I с ДНК, при котором в ДНК имеется разрыв, стабилизировать на фоне введения противоопухолевых препаратов, раковая клетка не сможет эффективно восстанавливаться и погибнет. Стабилизировать связанное с ДНК состояние топоизомеразы I можно с помощью соединений на основе камптотецина, которые взаимодействуют одновременно с белком и с ДНК.

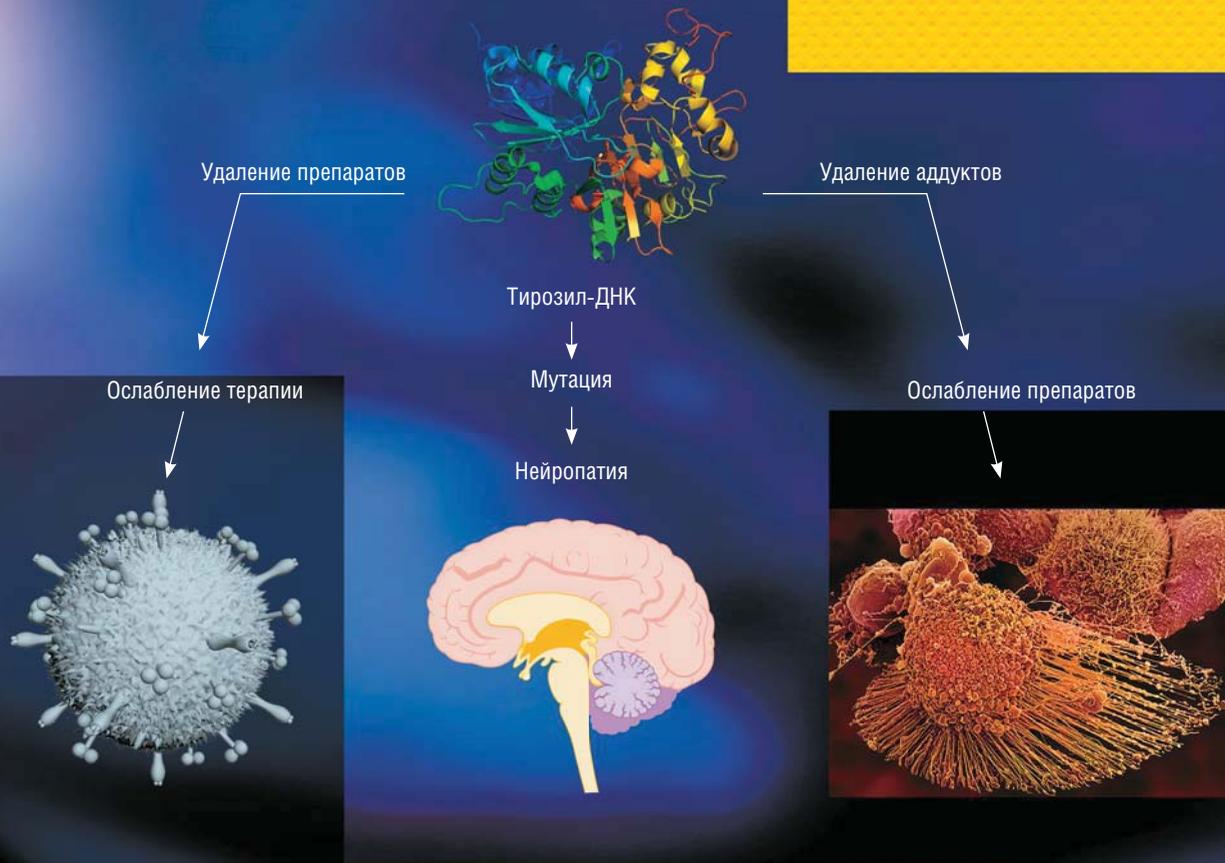
К таким препаратам относятся *топотекан*, *иринотекан* и *белотекан*. Они применяются в клинике, но восприимчивость к ним у пациентов очень разная. Когда стали разбираться с причинами этого, то выяснилось, что фермент Tdp1 способен снимать «стабилизацию» топоизомеразы I на ДНК, вызванную препаратами камптотецина. «Нокаутные» по гену Tdp1 клетки мыши и человеческие опухолевые клетки с мутацией в гене Tdp1 оказались гиперчувствительными к камптотецину, а повышенная экспрессия Tdp1, напротив, приводила к уменьшению числа повреждений ДНК, вызванных ингибиторами топоизомеразы I.

Кроме остатка топоизомеразы, Tdp1 может удалять с 3'-конца ДНК терминаторы синтеза ДНК, применяющиеся для лечения вирусных инфекций, такие как *ацикловир*, *азидотимидин*, *цитарабин* и др. Эти препараты представляют собой аналоги нуклеотидов, которые не очень точные вирусные полимеразы принимают за свои субстраты и встраивают в растущую цепь ДНК. Поскольку у этих соединений отсутствует 3'-гидроксильная группа, необходимая для дальнейшего роста цепи, синтез вирусной ДНК на этом заканчивается. Как показала в 2013 г. японско-американская группа ученых, Tdp1 способна удалять и эти соединения, мешая

лечению таких заболеваний, как *герпесвирусная инфекция*, *ВИЧ-инфекция* и *лейкемия*, вызванная вирусами.

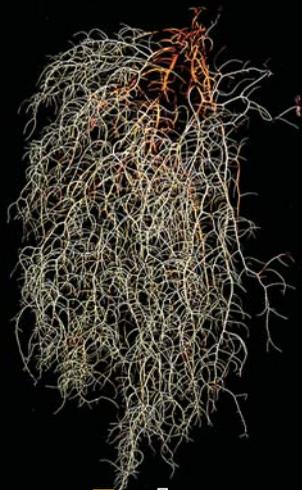
Таким образом, поиск ингибиторов Tdp1 стал очень актуальной задачей, для решения которой был создан совместный проект с отделом медицинской химии, возглавляемым доктором химических наук, профессором Н. Ф. Салахутдиновым, Института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (Новосибирск). Этот отдел имеет огромный опыт в получении потенциальных медицинских препаратов путем направленной модификации структуры биологически активных природных соединений.

Как ученые ищут вещества – потенциальные ингибиторы ферментов репарации? Сначала выбирается вещество из библиотеки природных соединений, обладающих противоопухолевыми свойствами. Потом проводятся компьютерное моделирование синтеза веществ и испытания их ингибиторных свойств на рекомбинантных белках. Если эффективность ингибирования оказывается низкой, синтезируются другие молекулы, и снова проводятся испытания. В случае успеха выбранные соединения проверяются на цитотоксичность. Так как для увеличения эффективности ингибиторов фермента мы предполагали использовать их совместно с аналогами камптотецина, то проверяли еще и суммарную цитотоксичность ингибиторов Tdp1 и производных камптотецина.

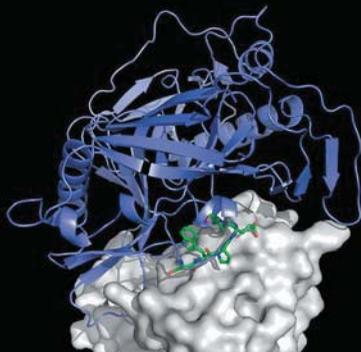


«Ремонт» ДНК не всегда приносит организму пользу. Только для фермента репарации тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 существует как минимум три случая, когда его работа очевидно наносит вред. Дело в том, что этот фермент удаляет с ДНК остаток другого фермента – топоизомеразы I, вносящей в цепь ДНК разрыв. В норме это происходит в рамках динамичного поддержания определенной конформации двойной спирали ДНК. Но при применении противоопухолевых препаратов связанное состояние топоизомеразы I с ДНК выгодно стабилизировать, чтобы раковая клетка не могла восстановить разрыв, т.е. TDP1 в этом случае помогает болезни, а не здоровому организму. Другой случай, когда TDP1 наносит вред, – это мутация в его активном центре, ведущая к замене аминокислоты гистидина на аргинин. В результате развивается нейродегенеративное заболевание спинocerebellарная атаксия-нейропатия. Наконец, активность TDP1 вредит при лечении вирусных заболеваний ингибиторами вирусных полимераз. Эти ингибиторы представляют собой аналоги нуклеозидов, которые фосфорилируются при попадании в клетку и становятся субстратами для вирусных полимераз, причем на них синтез ДНК и обрывается. TDP1 способна удалять из ДНК такие нуклеозиды-лекарства, что позволяет вирусным ферментам продолжить свое «черное дело»

Сравнительно недавно для TDP1 была открыта природная мутация, когда в активном центре фермента аминокислота гистидин заменяется на аргинин. Эта мутация приводит к развитию нейродегенеративного заболевания SCAN1 (спинocerebellарная атаксия-нейропатия). Такой фермент способен осуществить первую стадию катализа, ковалентно присоединяясь к ДНК, но не может завершить свою работу и остается «пришитым» к ДНК. Считается, что накопление подобных «сшивков» и приводит к развитию заболевания. Если это в самом деле так, то ингибиторы фермента могут помочь таким больным.



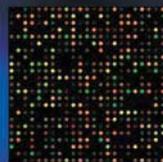
Природные соединения



Компьютерное моделирование



Синтез

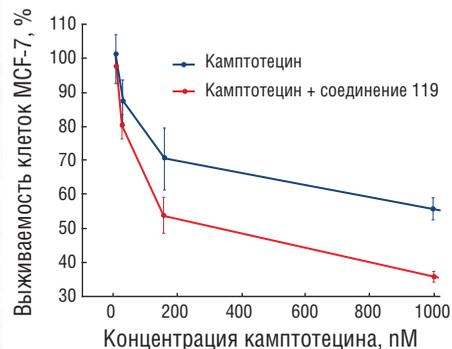


Скрининг *in vitro*



Анализ цитотоксичности

Влияние на цитотоксичность



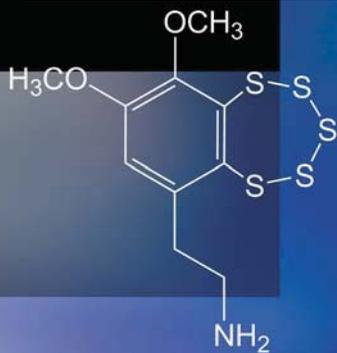
Лишайники, асцидии, цветы и нефть...

Вещество, с которого мы начали, – *варацин*, серосодержащее органическое соединение, которое выделяют из *морских асцидий*, низших хордовых животных. Химики создали его аналоги, и наиболее удачным оказался вариант, содержащий *алифатический радикал*. Математическое моделирование подтвердило: в активном центре Tdp1 есть гидрофобный карман, обеспечивающий высокое сродство к этому ингибитору. Цитотоксичность таких препаратов находится на среднем уровне, что хорошо, но, к сожалению, они не усиливают действия препаратов на основе камптотецина.

Мы обратились к другим классам соединений, в частности к монотерпеноидным производным *диазаадамантиана* – привлекательной для фармакологов структуры, которая обеспечивает препаратам хорошую биодоступность. Но эти соединения оказались малоэффективными.

Поиск ингибиторов репарации начинается с выбора вещества из библиотеки природных соединений, обладающих противоопухолевыми свойствами. Проводятся компьютерное моделирование, синтез веществ, испытания их ингибиторных свойств на рекомбинантных белках и исследования на цитотоксичность. В случае успеха – приемлемой токсичности и достаточно высокой эффективности – начинаются эксперименты на животных

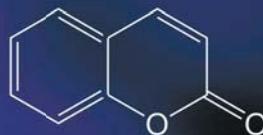
Новосибирские исследователи разработали оригинальный метод определения активности фермента Tdp1 в режиме реального времени, применив флуоресцентный подход. Был использован олигонуклеотид, на 3'-конце которого находился тушитель флуоресценции BHQ1, а на 5'-конце – флуоресцентная проба. Когда фермент удаляет 3'-концевой заместитель, наблюдается флуоресценция, а в присутствии ингибиторов она уменьшается. Силу ингибирования измеряли, используя показатель IC50 – это величина концентрации, при которой активность фермента падает вдвое



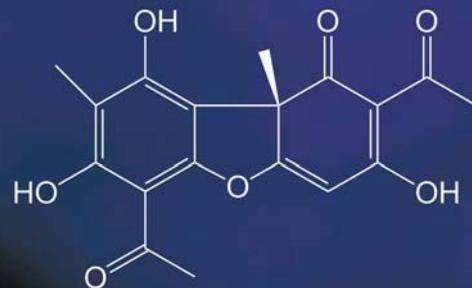
Варацин



Адамантан



Кумарин



Усниновая кислота



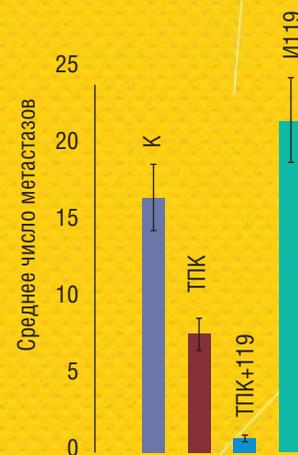
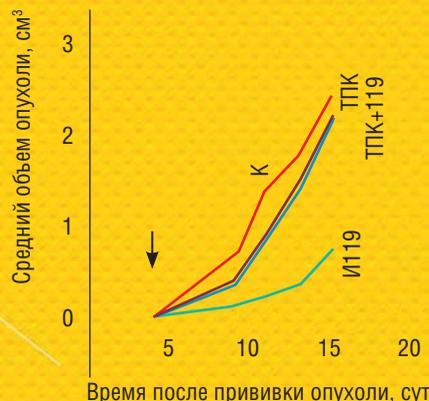
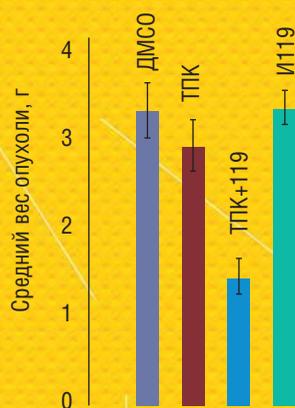
Ингибиторами фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1, т. е. потенциальными эффективными противоопухолевыми препаратами, могут быть производные природных соединений, обладающих антибактериальными, антиоксидантными, противовоспалительными, антитромботическими, противоопухолевыми свойствами. Слева направо: аналоги варацина, природного противоопухолевого соединения, синтезированные в НИОХ СО РАН. В асцидиях это целебное соединение встречается в ничтожно малых количествах, поэтому химический синтез удобнее и дешевле. То же самое можно сказать об адамантане, содержание которого в нефти составляет сотые доли процента. Десятки производных адамантана синтезированы в НИОХ СО РАН и изучаются как противоопухолевые и противовирусные средства. Кумарины – бициклические соединения, обладающие рядом полезных свойств. Среди производных кумарина обнаружены соединения – ингибиторы TDP1, способные усилить противоопухолевый эффект камптотецина. И, наконец, усниновая кислота – природное противоопухолевое, противомаларийное, противотуберкулезное, противовоспалительное средство. На ее основе получены мощнейшие на сегодняшний день ингибиторы TDP1, подавляющие активность фермента в наномолярных концентрациях. Многие из них, так же как кумарины, усиливают противоопухолевый эффект ингибиторов топоизомеразы

Первые обещающие результаты мы получили, работая с производными кумарина, а именно с *7-гидроксикумарином*, имеющим очень хорошие ингибиторные характеристики и почти не токсичным. Для этого класса соединений мы впервые получили увеличение цитотоксического эффекта камптотецина. И наконец нам удалось добиться увеличения цитотоксичности камптотецина примерно на порядок при работе с еще одним классом соединений – *энаминами усниновой кислоты*, которые к тому же показали низкую токсичность.

На сегодняшний день мы создали несколько классов ингибиторов Tdp1, превосходящих по характеристикам

уже описанные в мировой научной литературе. С лучшими из них были начаты испытания *in vivo*.

Эксперименты на животных показали, что использование одного из ингибиторов Tdp1 уменьшает у мышей вес первичной опухоли на 30–50%, если ингибитор применяется вместе с аналогом камптотецина – *топотеканом*. Эти исследования были проведены в группе доктора биологических наук Н. А. Поповой в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Эффект был замечен уже на 2–3 сутки после начала лечения и впоследствии только нарастал. Что очень важно, при этом в 3–5 раз



Одно из соединений, проходящее под условным номером 199 (И119), усиливает у мышей с привитой мышинной карциномой Льюиса противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана (ТПК) – одного из производных камптотецина, противоракового ингибитора топоизомеразы 1. Ингибитор 119 на 30–50% уменьшает вес первичной опухоли (слева), причем эффект заметен уже на 2–3 сутки после начала лечения и в дальнейшем нарастает (в центре), а число метастазов в легких уменьшается в 3–5 раз по сравнению с лечением одним топотеканом (справа)

уменьшилось число метастазов в легких животных. Этот результат уже привлек внимание исследователей, занимающихся клиническими испытаниями, и врачей-онкологов, поскольку ингибиторами топоизомеразы I лечатся такие грозные и распространенные заболевания, как рак легких и рак кишечника. Увеличение эффективности этой терапии или устранение резистентности опухоли к ней могли бы спасти тысячи жизней.

Исследование новосибирских ученых является оригинальной разработкой мирового уровня, проект был оценен Министерством науки и образования РФ как очень перспективный для проведения доклинических исследований. К сожалению, работа трех институтов по созданию противоракового препарата не была поддержана в недавнем конкурсе комплексных проектов СО РАН. Хочется верить, что в самом ближайшем будущем эти результаты будут оценены в Сибирском отделении РАН, и проект получит поддержку в силу его большой перспективности для увеличения продолжительности жизни онкобольных.

Для тех, кто занимается фундаментальными исследованиями, найти на их основе решение серьезной практической задачи является очень важным достижением в науке, и не может не радовать. Предмет наших исследований – системы репарации ДНК – безусловно, является не только основой жизни, но и чрезвычайно важен для будущего современной медицины.

Литература

Huang S. Y., Murai J., Dalla Rosa I. et al. TDP1 repairs nuclear and mitochondrial DNA damage induced by chain-terminating anticancer and antiviral nucleoside analogs // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 7793–7803.

Comeaux E. Q. van Waardenburg R. C. A. M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // *Drug Metabolism Reviews.* 2014. V. 46. N. 4. P. 494–507.

Zakharenko A. L., Khomenko T. M., Zhukova S. V. et al. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // *Bioorg Med Chem.* 2015. V. 23. P. 2044–2052.

Khomenko T., Zakharenko A., Odarchenko T. et al. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties // *Bioorg Med Chem.* 2016. V. 24. P. 5573–5581.

Zakharenko A., Luzina O., Koval O. et al. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors: Usnic Acid Enamines Enhance the Cytotoxic Effect of Camptothecin // *J Nat Prod.* 2016. V. 79. P. 2961–2967.

В проекте принимали участие: сотрудники ИХБФМ СО РАН Захаренко А.Л., Захарова О.Д., Анарбаев Р.О., Дырхеева Н.С., Лебедева Н.А. под руководством Лаврик О.И.; сотрудники НИОХ СО РАН Лузина О.А., Волчо К.П., Суслов Е.В., Соколов Д.Н., Хоменко Т.М. под руководством Салахутдинова Н.Ф.; сотрудники ИЦиГ СО РАН Каледин В.И., Николин В.И. под руководством Поповой Н.А.

Работа поддержана базовым проектом ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.57.1.2, 0309-2016-0001)



Россия Делает Сама

Новые аналоги ДНК для лечения наследственных
и инфекционных болезней

Весной 2014 г. в Москве в павильоне ВДНХ была развернута временная музейная экспозиция под названием «Россия делает сама», посвященная знаменитым отечественным ученым прошлого и настоящего, передовым технологиям, нацеленным в будущее. Один из экспонатов, рядом с которым всегда было немало посетителей, напоминал футуристическую голову инопланетянина с двумя огромными «глазами».

Это – макет изделия РДС-1, первой советской атомной бомбы, взорванной на Семипалатинском полигоне в августе 1949 г.

Есть несколько вариантов расшифровки сокращения РДС: от официального «реактивный двигатель специальный» до наиболее романтического «Россия делает сама», который и дал название упомянутой выставке (Новоселов, Толстиков, 1995). Авторство последней расшифровки приписывают нескольким персонам: от заместителя главного конструктора «Арзамаса-16» К. Щелкина

до руководителя атомного проекта Л. Берии. Открывший выставку министр культуры В. Мединский, остановившись у макета бомбы № 1, подчеркнул: «Этот экспонат должен напомнить всем нам, что Россия действительно многое может делать сама. Разоренная, еще не оправившаяся после войны, она сделала эту бомбу всего за два года и восемь месяцев с момента принятия решения и до первых испытаний».

«Да полноте! – скажет кто-нибудь из завсегдадаев интернета. – Какое там “Россия делает сама”? Всем известно, что чертежи атомной бомбы были добыты советской разведкой в США. Так что нашим ученым оставалось только воспроизвести чужое изобретение, созданное гением западных ученых».

Спору нет, разведка сработала на «отлично», что намного ускорило работу над РДС-1.

Но плутоний для этого пришлось добывать самим. И не только плутоний: пришлось искать оригинальные конструкторские решения, создавать новое уникальное оборудование, фактически закладывать фундамент новых отраслей промышленности и областей науки. И эту работу наша страна второй половины роковых сороковых годов прошлого века сумела выполнить сама. Главный результат ее остается с нами и по сей день. Говоря словами физика Гусева, героя фильма М. Ромма «Девять дней одного года», «без этого нас бы не было»

Ключевые слова: терапевтические нуклеиновые кислоты, антисмысловые олигонуклеотиды.

Key words: nucleic acid therapeutics, antisense oligonucleotides

© Д. А. Стеценко, 2017

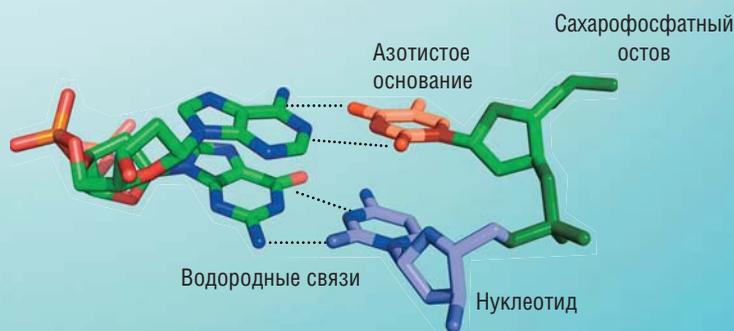
Сегодня нам стоит почаще вспоминать, что Россия и в самом деле сама может делать многое руками своих граждан: рабочих, инженеров, ученых. Особенно важной представляется роль ученых, которые по сути своей деятельности обязаны быть на острие поиска. И не только в ядерной физике, но и в химии, биологии, в общественных дисциплинах – на всех направлениях развития науки.

Роль биологии в последние годы по ряду причин представляется определяющей. Развитие постгеномных технологий, методов персонализированной медицины, открытие способа направленного редактирования «святой святых» живого организма – генома требуют к себе пристального внимания в силу того значения, которое эти технологии приобретают для сферы здравоохранения и поддержания благополучия человека.

В эпоху бурного развития науки, формирования нового технологического уклада легко упустить момент и в результате оказаться на обочине прогресса. Ведь даже только для того, чтобы оставаться на месте, «нужно бежать со всех ног», как советовали Алисе из известной сказки Л. Кэрролла. Отстающих же в современном мире ожидает незавидная участь – оплачивать высокотехнологичные продукты, произведенные лидерами мировой технологической гонки, причем за счет своих невосполнимых природных и человеческих ресурсов.



СТЕЦЕНКО Дмитрий Александрович – кандидат химических наук, заведующий лабораторией химии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор более 80 научных публикаций и 4 патентов



Нуклеиновые кислоты представляют собой природные биополимеры, состоящие из многократно повторяющихся звеньев-нуклеотидов. В состав каждого нуклеотида входит азотистое основание, моносахарид рибоза или дезоксирибоза и фосфатная группа, соединяющая нуклеотиды в единый сахарофосфатный остов. К остову ДНК присоединены основания четырех видов: аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц). Основания двух молекул ДНК могут соединяться в пары водородными связями по принципу «комплементарности»: против А – только Т, против Г – Ц. Так формируется знаменитая двойная спираль ДНК

Одним из основных компонентов прогресса в области биологии является сумма технологий, основанных на использовании нуклеиновых кислот – ДНК и РНК. Отечественным ученым по праву принадлежит ряд исторических прозрений в этой области науки. Ровно полвека назад, когда основы современной молекулярной биологии еще только закладывались, Нина Ивановна Гринева выдвинула идею воздействовать на участки клеточных молекул нуклеиновых кислот с помощью комплементарных им коротких синтетических фрагментов тех же нуклеиновых кислот – *олигонуклеотидов*, несущих реакционноспособные группы (Belikova, Zarytova, Grineva, 1967).

Несовершенство доступных на тот момент химических методов получения олигонуклеотидов не позволило автору и ее последователям в полной мере реализовать эту революционную идею. Но как только достижения химии нуклеиновых кислот превратили олигонуклеотидный синтез из сочетания высокого искусства и каторжного труда в ремесло, доступное, по сути, квалифицированным лаборантам, прогресс в области ДНК- и РНК-технологий начал развиваться семимильными шагами.

Старт антисмысловых технологий

По прошествии чуть более десятка лет со дня публикации статьи Н. И. Гриневой американский ученый чешского происхождения П. Замечник впервые показал, что синтетический олигонуклеотид, нацеленный на комплементарное связывание с определенным

участком вирусной РНК, способен подавлять развитие вируса в живых клетках (Zamecnik & Stephenson, 1978). Именно с этого момента принято отсчитывать возникновение *антисмысловой технологии* – способа направленного воздействия на процесс трансляции генетической информации, другими словами, на осмысленный перевод с нуклеотидного языка матрицы РНК на язык аминокислот, который происходит в клетке при биосинтезе белковых молекул.

При этом следует различать два возможных механизма реализации антисмыслового действия олигонуклеотида. Один из них основан на создании физического препятствия рибосоме в процессе биосинтеза белка за счет образования прочного комплекса антисмыслового олигонуклеотида с комплементарным участком матричной РНК. Рибосома не может преодолеть двухцепочечный участок и продолжить наращивание аминокислотной цепи аминокислот до полноразмерного белка, но матричная РНК при этом остается неповрежденной. В случае другого механизма в месте образования комплементарного комплекса матричной РНК с антисмысловым олигонуклеотидом молекула РНК может начать необратимо разрушаться под действием клеточного фермента *РНКаза H*. Этот механизм предъявляет жесткие требования к структуре антисмыслового олигонуклеотида, которая должна максимально соответствовать структуре природной одноцепочечной молекулы ДНК.

К началу лихих для России 1990-х антисмысловая технология была осознана на Западе как новый терапевтический принцип (Uhlmann & Peuman, 1990). Быстро выяснилось, что природные олигонуклеотиды



Автор идеи комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот, Н. И. Гринева, в 1960 г. была принята старшим научным сотрудником в лабораторию природных полимеров (впоследствии – отдел биохимии) Института органической химии СО АН СССР (Новосибирск), которой руководил Д. Г. Кнорре. За создание основ адресованной модификации генетических структур Кнорре и Гринева в 1991 г. были награждены Ленинской премией. *На фото* – коллектив лаборатории природных полимеров НИОХ СО АН СССР, 1964 г. *В первом ряду:* Н. И. Гринева (*крайняя слева*), Д. Г. Кнорре (*в центре*), соавтор Гриневой, аспирантка А. М. Беликова (*крайняя справа*)

малопригодны для использования в качестве лекарственных препаратов. При введении в организм они быстро разрушались ферментами-нуклеазами, присутствующими в сыворотке крови. Однако к этому времени были уже доступны химически модифицированные аналоги нуклеиновых кислот, в которых место природной фосфатной группы заняли ее искусственные заменители – так называемые *изостеры*. В этих соединениях один из атомов кислорода при атоме фосфора, не участвующий в образовании межнуклеотидного мостика, заменяется другим атомом или группой. Такая замена в большинстве случаев влечет за собой значительное возрастание устойчивости олигонуклеотида к действию ферментов, легко расщепляющих природные фосфатные группы.

Первыми аналогами ДНК с модифицированной фосфатной группой стали *метилфосфонаты*, содержащие метильный радикал $-CH_3$, и *тиофосфаты* с атомом серы. При этом замещение всех фосфатных групп метильными радикалами превращало метилфосфонаты в электронейтральные соединения, в то время как тиофосфаты сохраняли отрицательный заряд.

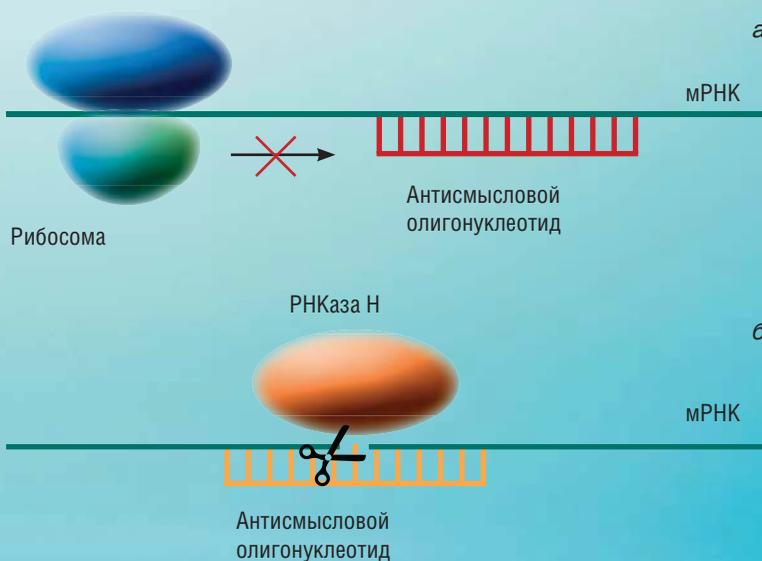
Как следствие, основное различие между этими аналогами ДНК заключалось в том, что первые могли

работать только по принципу физического блокирования рибосомы, а вторые успешно активировали РНКазу Н с сопутствующим разрушением матричной РНК. Возможно, именно этот факт отчасти повлиял на дальнейшую судьбу этих соединений: метилфосфонаты к настоящему времени практически сошли со сцены, а тиофосфаты составляют три четверти всех допущенных в практику лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот.

Бурное развитие антисмысловой технологии на Западе с начала 1990-х, последующее открытие американскими учеными РНК-интерференции, а за ним и геномного редактирования поставили отечественных ученых в положение постоянно догоняющих. Несмотря на богатые традиции в области химии нуклеиновых кислот, ранее достигнутые результаты и наличие научных и образовательных центров с мощным потенциалом, нашим исследователям, за редким исключением, не удалось внести существенный вклад в создание новых антисмысловых аналогов ДНК или РНК, способных успешно конкурировать с иностранными разработками.

«Первой ласточкой», изменившей ситуацию, стало открытие в 2012 г. *фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов* (ФГО) исследователями из новосибирского

Выделяют два варианта механизма антисмыслового действия олигонуклеотидов. В первом случае олигонуклеотид, образуя комплементарный комплекс с молекулой РНК-мишени, физически препятствует рибосоме синтезировать белок на матрице РНК, т. е. блокирует процесс трансляции (а). Во втором случае комплекс антисмыслового олигонуклеотида с РНК-мишенью служит субстратом клеточного фермента РНКазы Н, который необратимо разрушает матричную РНК в месте образования комплекса (б)



Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Стеценко, Пышный, 2014). Фосфорилгуанидины явились, по сути, первым технологически конкурентоспособным продуктом отечественной химии нуклеиновых кислот за последние десятилетия.

Так как фосфорилгуанидиновая группа не несет электрического заряда, можно сказать, что ФГО в известном смысле заняли «экологическую нишу» метилфосфонатов. Однако, в отличие от последних, фосфорилгуанидины могут быть получены из относительно недорогих и коммерчески доступных исходных

материалов с использованием высокоэффективных методов химического синтеза (Stetsenko *et al.*, 2014). Они также отличаются высокой химической устойчивостью, а фосфорилгуанидиновая группа не препятствует комплементарному связыванию с РНК-мишенью.

При угрозе жизни

С момента своего открытия фосфорилгуанидины успели зарекомендовать себя как перспективные антисмысловые агенты, действующие по механизму физического блокирования синтеза белка, в частности как потенциальные лекарственные препараты для коррекции тяжелого генетического заболевания – *мышечной дистрофии Дюшена*. Это заболевание выражается в прогрессирующей дегенерации скелетных мышц, вызванной прекращением биосинтеза белка *дистрофина*.

По классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), эта болезнь относится к числу редких, хотя она является наиболее распространенным генетическим нарушением, диагностируемым в детстве. Симптомы прогрессирующей дегенерации мышц начинают проявляться уже в возрасте 5–6 лет, а к 10 годам ребенок может передвигаться только в инвалидном кресле. Средняя продолжительность жизни больных мышечной дистрофией Дюшена составляет 25–30 лет.

Причина болезни – мутации в гене дистрофина, из которых две трети возникают спонтанно, и лишь одна треть является унаследованной. Это означает, что с определенной долей вероятности болезнь может прийти в любую семью.

«Секрет» получения фосфорилгуанидинов заключается в замене одной из стадий химического синтеза обычных олигонуклеотидов другой химической реакцией, а именно реакцией Штаудингера, названной в честь ее первооткрывателя – швейцарского химика Г. Штаудингера (Staudinger & Meyer, 1919). Начиная с 1970-х гг. реакция Штаудингера эпизодически использовалась для получения производных нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Однако в полном смысле слова огромный потенциал этой реакции для получения самых разнообразных аналогов ДНК и РНК с модифицированной фосфатной группой был распознан лишь недавно. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды явились первым типом электронейтральных аналогов нуклеиновых кислот, которые стали получать с использованием реакции Штаудингера, протекающей в автоматическом синтезаторе ДНК

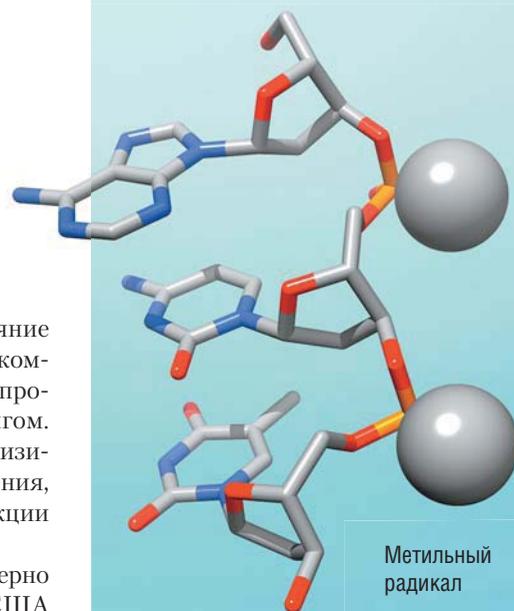
Уже более десяти лет назад стало ясно, что разрушительное влияние генной мутации при мышечной дистрофии Дюшена можно отчасти компенсировать путем направленного воздействия на важную стадию процесса получения «зрелой» матричной РНК, называемую сплайсингом. Антисмысловые олигонуклеотиды, способные вызывать временную физическую блокаду определенного участка молекулы РНК без ее разрушения, рассматриваются в качестве наиболее перспективных средств коррекции сплайсинга.

Считается, что подобная терапия могла бы облегчить состояние примерно 80% всех больных. В сентябре 2016 г. на фармацевтический рынок США уже поступил первый терапевтический препарат для лечения мышечной дистрофии Дюшена на основе аналога олигонуклеотида – *Eteplirsen* (*Exondys 51*). Результаты, полученные исследователями из ИХБФМ СО РАН в сотрудничестве с британскими коллегами из Оксфордского университета, показали, что активность ФГО в экспериментах на лабораторных мышцах превосходит активность зарубежного аналога, соответствующего по химической структуре препарату *Eteplirsen*.

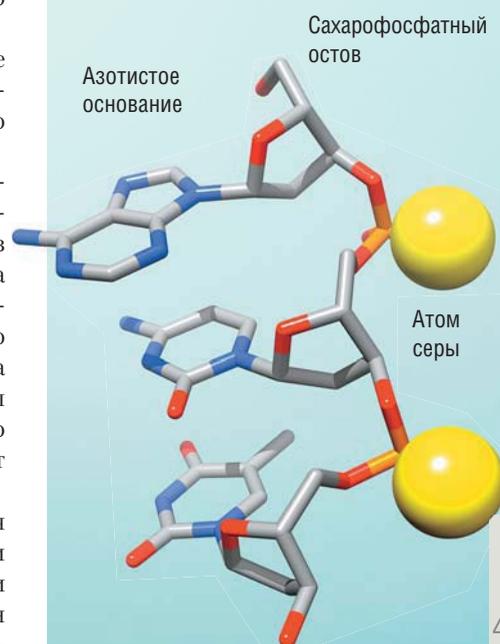
Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды продемонстрировали также мощное противовирусное действие в лабораторных экспериментах на культуре клеток, инфицированных высокопатогенным вирусом «птичьего гриппа» подтипа H5N1.

Поскольку стоимость подобной противовирусной терапии будет существенно выше, чем в случае лекарственных препаратов на основе малых молекул, таких как Тамифлю, применение антисмысловых олигонуклеотидов будет наиболее оправдано в случаях, когда имеется непосредственная угроза жизни больного. Американская компания *Sarepta Therapeutics* ведет разработку терапевтических олигонуклеотидов для лечения таких смертельно опасных вирусных заболеваний, как геморрагические лихорадки Эбола и Марбург, а финансирует ее Министерство обороны США. Препараты под кодовыми наименованиями AVI-7537 и AVI-7288 уже показали свою эффективность в лабораторных опытах на животных и сейчас проходят клинические испытания.

Но в фармацевтическом бизнесе, как и на всяком рынке, где вращаются большие деньги, не обходится без казусов. Так, в 2014 г. в США при лечении врача, заболевшего геморрагической лихорадкой Эбола во время эпидемии в Западной Африке, в составе комбинированной терапии был использован экспериментальный олигонуклеотидный препарат ТКМ-Ebola, не прошедший на тот момент клинических испытаний. Пациента удалось вылечить, но какую роль в этом сыграл терапевтический олигонуклеотид, осталось неизвестным. Тем не менее благодаря такой «рекламе» стоимость акций разработчика препарата канадской компании *Tekmira Pharmaceuticals* подскочила сразу на четверть. Однако уже в следующем году компания прекратила дальнейшие клинические испытания лекарства, признав его недостаточную эффективность. Сейчас эта фирма, сменившая название на *Arbutus BioPharma*, разрабатывает терапевтический олигонуклеотид против гепатита Б.

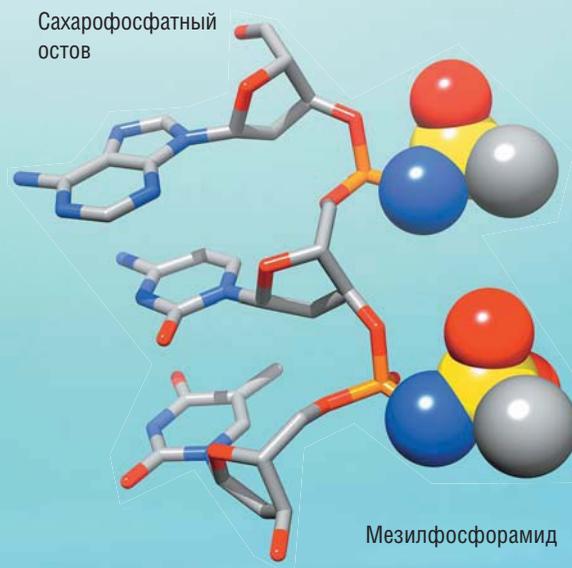
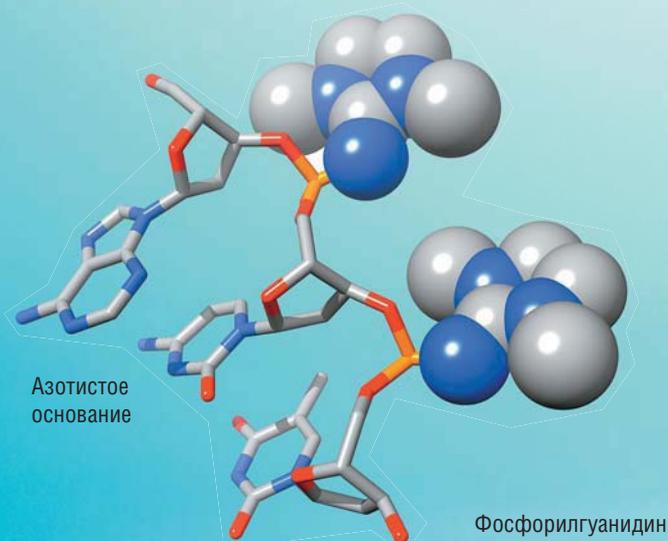


Метилфосфонат



Тиофосфат

Аналоги нуклеиновых кислот получают, в том числе, путем замены одного из атомов кислорода в фосфатной группе на другой атом или группу атомов: при замене на метильный радикал образуются метилфосфонаты, на атом серы – тиофосфаты



Устойчивость к антибиотикам — новый вызов человечеству

Борьба со смертельно опасными инфекциями, как вирусными, так и бактериальными, сегодня рассматривается в качестве одного из основных направлений применения терапевтических олигонуклеотидов. В ряду подобных болезней особо выделяются инфекции, вызываемые лекарственно-устойчивыми штаммами патогенных микроорганизмов, таких как малярийный плазмодий, туберкулезная палочка или золотистый стафилококк. Глобальное распространение бактериальных инфекций, характеризующихся устойчивостью сразу к нескольким антибиотикам, уже давно вызывает тревогу у экспертов ВОЗ, которые рассматривают их как одну из серьезнейших угроз для здоровья человека. По мнению экспертов, задача борьбы с глобальным распространением этих инфекций представляет собой вызов всему человечеству и потому не может быть успешно решена в рамках одного государства. Однако в России, в отличие от ведущих зарубежных стран, этой теме все еще уделяется недостаточно внимания.

Бактерии, вирусы, грибки и другие микроорганизмы теряют восприимчивость к традиционным антимикробным препаратам из-за генетических мутаций, которые затем закрепляются в их потомстве. Возникновение все новых механизмов лекарственной резистентности и широкое распространение по планете таких устойчивых штаммов ставит под угрозу саму способность врачей лечить обычные инфекционные заболевания, удлиняя сроки выздоровления и увеличивая вероятность инвалидизации и смертельного исхода, а также риск распространения инфекции среди здоровых людей.

У новых аналогов олигонуклеотидов, полученных новосибирскими химиками, фосфатная группа превращена в электронейтральную фосфорилгуанидиновую или отрицательно заряженную мезилфосфорамидную группу. В последнем случае получаются соединения, более близкие к одноцепочечным молекулам ДНК

Без эффективных противомикробных препаратов такие медицинские процедуры, как трансплантация органов, химиотерапия онкологических заболеваний, лечение диабета или любая серьезная хирургическая операция (например, кесарево сечение или удаление аппендикса), становятся рискованными. Расходы на лечение пациентов при этом резко возрастают, а само лечение занимает больше времени, что приводит к значительному удорожанию медицинских услуг.

Особенно остро сейчас стоит проблема вспышек внутрибольничных инфекций, таких как пневмония, заражение крови (сепсис), инфекции у новорожденных и больных в отделениях реанимации. Их возбудителями очень часто являются устойчивые к антибиотикам штаммы бактерий. Так, в сентябре 2016 г. в больнице американского штата Невада врачи не смогли спасти жизнь пожилой пациентке с бактериальной инфекцией, которая оказалась нечувствительной ко всем 26 видам антибиотиков, назначаемых в США. Положение усугубляется тем, что за прошедшие 30 лет не было

Визуализация химических структур выполнена в лаборатории структурной биоинформатики и молекулярного моделирования НГУ.

Авторы и редакция благодарят заведующую лабораторией, к.б.н. А.Ю. Бакулину за помощь в подготовке иллюстраций

В феврале 2017 г. ВОЗ впервые опубликовала список из 12 видов бактериальных патогенов, устойчивых к действию антибиотиков, разработка методов борьбы с которыми была признана высокоприоритетной. В этом списке к первой группе («критический уровень приоритетности») относятся бактерии со множественной лекарственной устойчивостью, представляющие особенно серьезную опасность для пациентов больницы и лечебно-реабилитационных центров, в особенности тех пациентов, для лечения которых требуются медицинские устройства, такие как аппараты искусственной вентиляции легких и венозные катетеры. У бактерий этой группы успела сформироваться устойчивость к действию широкого ряда антибиотиков, включая карбапенемы и цефалоспорины третьего поколения, которые на сегодняшний день относятся к наиболее эффективным препаратам для лечения инфекций со множественной лекарственной устойчивостью

открыто ни одного нового класса антибиотиков. Некоторые эксперты уже предрекают, что человечество стоит на пороге возвращения в мрачные времена «доантибиотиковой» эры, когда простой порез на пальце мог стать причиной смерти, как это случилось с героем романа И. Тургенева «Отцы и дети».

Антисмысловые олигонуклеотиды, способные избирательно подавлять экспрессию отдельно взятых генов, рассматриваются как перспективные инструменты для преодоления резистентности болезнетворных микроорганизмов. Их действие может быть нацелено на подавление экспрессии тех генов, которые жизненно необходимы для роста и размножения бактерий либо непосредственно отвечают за лекарственную устойчивость. В последнем случае задача антисмысловой технологии заключается в восстановлении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, что представляется наиболее актуальным при разработке новых способов борьбы с устойчивыми штаммами возбудителей бактериальных инфекций.

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, полученные в ИХБФМ СО РАН, сейчас исследуются в качестве потенциальных антибактериальных средств против нескольких мишеней, в частности возбудителя туберкулеза. Недавно специалистам лаборатории химии нуклеиновых кислот института с помощью все той же реакции Штаудингера удалось создать еще один вид аналогов ДНК. Новые аналоги олигонуклеотидов, названные *мезилфосфорамидами*, по своей структуре ближе к природной одноцепочечной молекуле ДНК, чем к ФГО. Главное их отличие состоит в сохранении суммарного отрицательного заряда, что позволяет им успешно активировать действие РНКазы H в месте

образования комплементарного комплекса с целевой ДНК. Это достоинство наряду с относительно простым способом получения открывает перспективы использования мезилфосфорамидных олигонуклеотидов как антисмысловых агентов. И этот прогноз уже получил первое подтверждение в экспериментах на клеточных культурах.

Нет сомнения, что российская наука вообще и медицинская химия в частности призваны сыграть одну из ведущих ролей в разработке передовых технологий противодействия распространению инфекционных заболеваний. Не будет преувеличением предсказать, что получение новосибирскими химиками новых аналогов олигонуклеотидов станет решительным шагом на пути создания эффективных средств борьбы не только с редкими генетическими заболеваниями, но и с более социально значимыми вирусными и бактериальными инфекциями. И не только с уже существующими, но и теми, с которыми человечество может столкнуться в будущем.

Задача овладения передовыми медицинскими технологиями может оказаться сегодня не менее стратегически важной для государства, чем в свое время овладение атомным оружием. Россия может и должна обладать собственными средствами реагирования на глобальные вызовы, угрожающие безопасности страны. Хочется верить, что она вновь сможет сделать это сама, как РДС-1 семь десятилетий назад.

Литература

Власов В.В. Лекарство для генов // НАУКА из первых рук. 2007. Т. 14. № 2. С. 56–59.

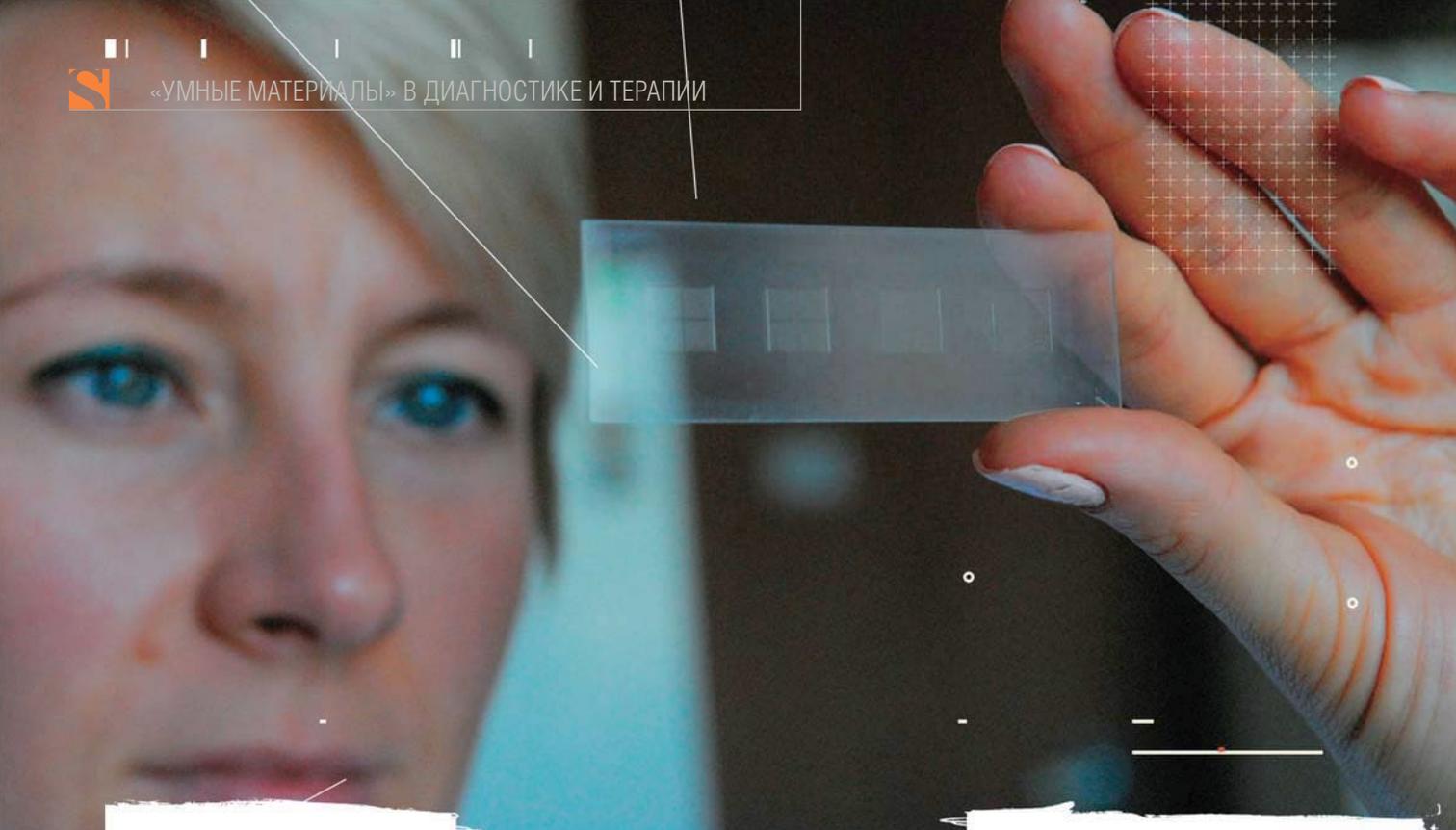
Стеценко Д.А., Пышный Д.В. Ex Siberia semper novi – из Сибири всегда новое. Фосфорилгуанидины – новые химические аналоги нуклеиновых кислот. // НАУКА из первых рук. 2014. Т. 59. № 5. С. 7–9.

Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. // Tetrahedron Lett. 1967. V. 8. N. 37. P. 3557–3562.

Stetsenko D., Kupryshkin M., Pyshnyi D. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis, patent application WO2016/028187A1 from August 22, 2014.

Uhlmann E., Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle // Chem. Rev. 1990. V. 90. N. 4. P. 543–584.

Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. N. 1. P. 280–284.



*К 80-летию со дня рождения
академика Андрея Дарьевича Мирзабекова –
основателя технологии 3D-гидрогелевых
биологических микрочипов*

БИОЧИПЫ — ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

*На фото: гидрогелевый биочип
высокой плотности демонстрирует
м.н.с лаборатории биологических
микрочипов ИМБ РАН Ольга Антонова*

Открытие функционального значения тысяч генов и молекулярных механизмов действия множества ферментов стало революционным событием в биологии, оказавшим и продолжающим оказывать огромное влияние на развитие медицины XXI в. Перед учеными и медиками открылись уникальные возможности для выяснения причин многих инфекционных и наследственных заболеваний, а также разработки эффективных методов их лечения. В свою очередь, развитие новых диагностических методов потребовало и создания новых технологий многопараметрического анализа биологических образцов, с помощью которых можно одновременно исследовать множество белковых и ДНК-маркеров различных заболеваний, функционально-значимых биологических макромолекул и их комплексов. Так появилась технология биологических микрочипов, способных, подобно микрочипам электронным, извлекать и обрабатывать огромные массивы информации из одного небольшого образца биологического материала, полученного от конкретного пациента



ГРЯДУНОВ Дмитрий Александрович – кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе и заведующий лабораторией технологий молекулярной диагностики ИМБ РАН (Москва). Лауреат Государственной премии РФ для молодых ученых (2003), российской Премии Галена (2014). Автор и соавтор 60 научных работ и 27 патентов



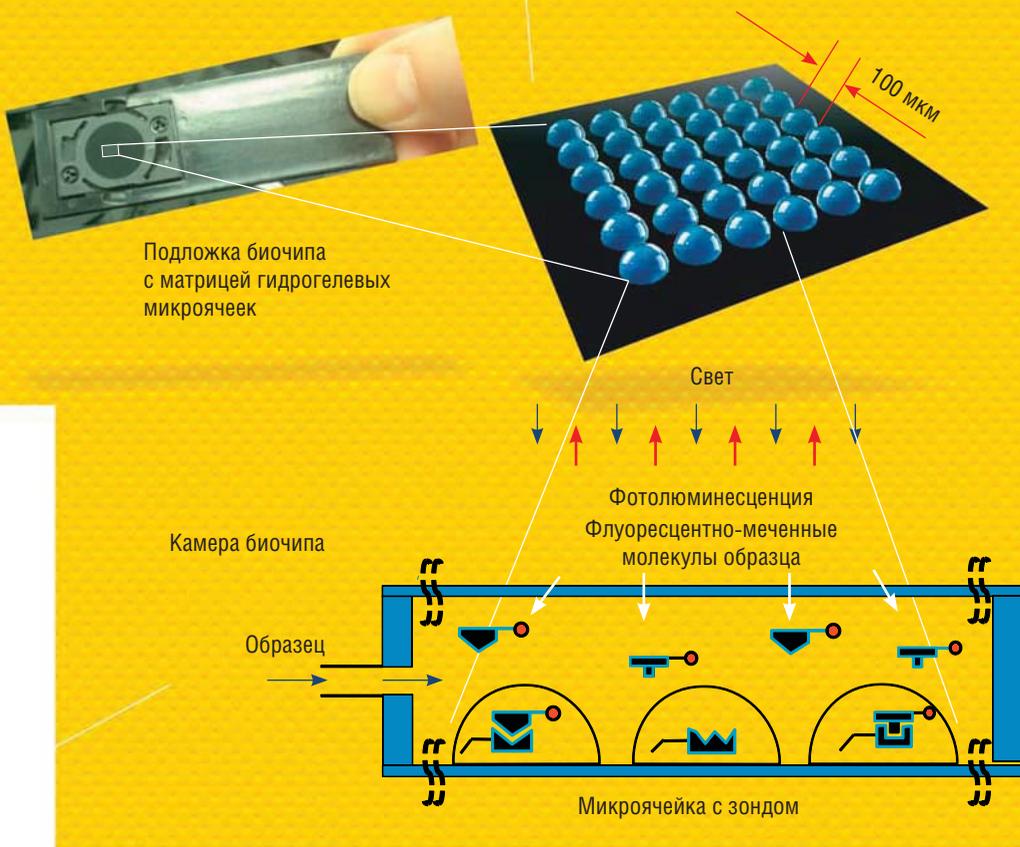
ЗАСЕДАТЕЛЕВ Александр Сергеевич – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией биологических микрочипов ИМБ РАН (Москва), заведующий кафедрой молекулярной и клеточной биологии Московского физико-технического института. Лауреат российской Премии Галена (2014), кавалер ордена Академических Пальм Франции (2016). Автор и соавтор 190 научных работ и 37 патентов

За последние десятилетия был накоплен огромный объем знаний о молекулярных основах биохимических процессов в живых организмах. Это дало возможности не только точно диагностировать то или иное заболевание, но и оценить вероятность его возникновения еще до проявления у пациента клинических симптомов, а также подобрать эффективную терапию. Подавляющую часть такой информации получают с помощью лабораторной диагностики, на которую в мире ежегодно расходуется свыше 100 млрд долларов. В России в 1970 г. она насчитывала 81 биохимический / молекулярный тест, в 2000 г. – 170, а сегодня число тестов измеряется тысячами!

Большинство важнейших современных методов молекулярной диагностики основано на анализе данных, полученных при исследовании структуры геномов человека и микроорганизмов. В первую очередь речь идет о полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обычно ДНК содержится в образцах в минимальных количествах, однако с помощью ПЦР можно в миллионы раз «размножить» в исследуемой пробе биоматериала определенные фрагменты этих макромолекул. «Мишенями» могут служить бактериальные или вирусные гены, генетические маркеры раковых опухолей и т. п. С помощью этого метода можно определить наличие, к примеру, возбудителя болезни, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул его ДНК.

Ключевые слова: гидрогелевые биочипы, туберкулез, лекарственная устойчивость, вирус гепатита С, лейкемия, хромосомные транслокации, онкомаркеры, фармакогенетика, иммуноанализ, аллергены.
Key words: hydrogel biochips, tuberculosis, drug resistance, Hepatitis C virus, leukemia, chromosomal translocations, cancer biomarkers, pharmacogenetics, immune analysis, allergens

© Д. А. Грядун, А. С. Заседателев, 2017



В биочипе ячейки с иммобилизованными зондами располагаются упорядоченными рядами, причем каждая ячейка содержит уникальный зонд. В зависимости от типа биочипа диаметр ячеек варьирует от 50 до 300 мкм, а их число зависит от сложности анализируемой мишени(ей) и задач эксперимента и составляет от нескольких десятков до нескольких тысяч. Молекулы исследуемого образца помечают флуоресцентной меткой, поэтому при облучении светом определенной длины волны ячейки, где произошло связывание зондов с молекулами-мишенями, будут светиться (две крайние ячейки)

В 2011 г. Национальная ассоциация фтизиатров России наградила ИМБ РАН кубком и дипломом «Лучший инновационный проект» за разработку молекулярно-генетической технологии биологических микрочипов и создание тест-системы для диагностики туберкулеза на ее основе. Согласно расчетам, выполненным ФГУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения», «...экономия бюджетных средств при внедрении технологии биочипов для диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности возбудителя составляет не менее 70 рублей на каждый вложенный рубль» (Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2009)

Однако возможности методов, базирующихся на ПЦР, ограничены в случае, когда речь идет об одновременном анализе десятков и сотен различных биомаркеров. И здесь на первый план выходит уже успешно зарекомендовавшая себя технология *биологических микрочипов* (биочипов). Достоинство этой технологии в том, что тест проводится в формате «один образец – один реакционный объем биочипа», т.е. образец не нужно разделять на несколько частей и их отдельно анализировать. Такой формат намного повышает чувствительность анализа и снижает его трудоемкость и стоимость, что дает возможность клинико-диагностическим лабораториям тестировать десятки и сотни образцов за одну рабочую смену.

Сегодня ведущие научные журналы регулярно публикуют обзоры, посвященные биологическим микрочипам, которые производят многие десятки компаний, а объем продаж составляет сотни миллионов долларов в год. Вместе с тем сама идея создания биочипов родилась лишь четверть века назад, и одним из мест рождения этой технологии стал Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

С самого начала подход российских исследователей отличался удачным выбором ключевых технологических решений, благодаря которым технологии биочипов ИМБ РАН продолжают оставаться конку-

РОССИЯ – ПИОНЕР «БИОЧИПСТРОЕНИЯ»

Большие матрицы с ДНК и белками, иммобилизованными на фильтре или зафиксированными в лунках планшета, были известны достаточно давно. Но идея о создании микрочипов современного формата появилась лишь в конце прошлого века. Первая работа по ДНК-микрочипам и одна из первых – по белковым чипам были опубликованы группой академика А. Д. Мирзабекова из московского Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР (Khrapko *et al.*, 1989; Arenkov *et al.*, 2000).

Эта революционная идея родилась как предложение для нового метода секвенирования ДНК с использованием гибридизации – процесса объединения двух комплементарных одноцепочечных молекул ДНК в двуцепочечную. Работы по совершенствованию методик секвенирования были стимулированы все более возрастающим интересом к проблеме расшифровки генома человека.

В то время в научной среде широко дискутировался вопрос, должна ли эта задача решаться масштабированием существующих подходов или нужно разрабатывать новые, более эффективные. Ученые сначала пошли по первому пути. Так, в 1977 г. появился «метод Сенгера», основанный на ферментативном синтезе комплементарной последовательности ДНК на матрице анализируемой одноцепочечной ДНК, а его разработчики получили в 1980 г. Нобелевскую премию. В своей нобелевской речи один из лауреатов, американский биохимик У. Гилберт, отметил, что «идея метода

пришла только после второго визита А. Мирзабекова» в его лабораторию (Gilbert, 1984).

При секвенировании гибридизацией «расшифровка» ДНК идет не отдельными буквами-нуклеотидами, а «словами» определенной величины, и такой словарь может содержать тысячи слов. Стала очевидной необходимость создания микрочипов: в это время и вышла первая статья ученых из ИМБ, где были описаны приготовление и свойства гелевых микрочипов (Khrapko *et al.*, 1989).

Технология производства гелевых биочипов прошла несколько этапов развития. Технология первого поколения, еще достаточно громоздкая и несовершенная, была разработана и запатентована в ИМБ в 1989—1993 гг., а впоследствии реализована в совместной лаборатории, организованной институтом и Аргоннской национальной лабораторией (США), и лицензирована американскими компаниями Motorola и Packard Instruments. Однако из-за технологических проблем фирмы стали производить биочипы, матрица которых представляла собой поверхность, сплошь покрытую полиакриламидным гелем.

В ИМБ РАН технология гелевых биочипов продолжала развиваться. Современная, достаточно простая, универсальная и дешевая технология позволяет производить даже в лабораторных условиях сотни и тысячи олигонуклеотидных, ДНКовых или белковых микрочипов в день (Колчинский и др., 2004)

рентоспособными в мировой науке. Многие из этих подходов (например, замена радиоактивных меток на флуоресцентные, применение гидрогеля и элементов сферической формы) стали использовать в своей работе другие исследователи, занимающиеся разработкой биочипов. А с 2000 г. в ИМБ РАН при поддержке Международного научно-технического центра начались работы по созданию биочипов для медицинской диагностики возбудителей социально значимых заболеваний.

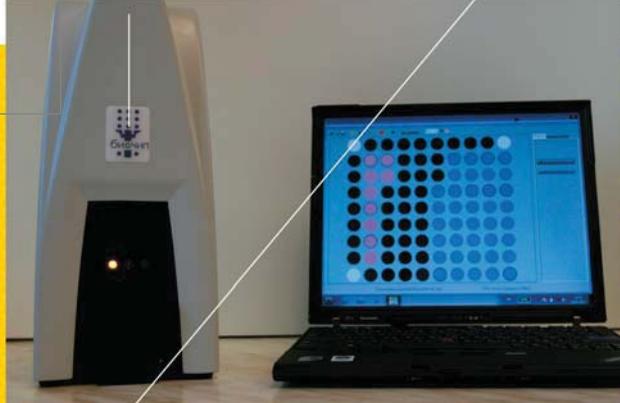
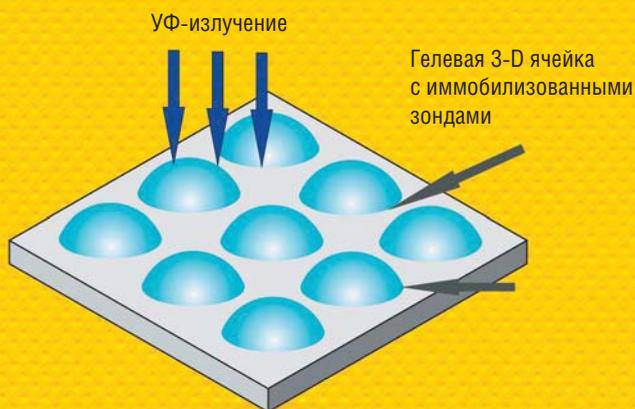
Биочипы в деле

Главным элементом любого биочипа служит матрица из сотен и тысяч микроячеек, каждая из которых содержит так называемые *молекулярные зонды* – молекулы, способные специфично связываться только со строго определенными биологическими молекулами или их фрагментами. Зондами могут служить олигонуклеотиды, участки геномной ДНК, РНК, антитела, олигосахариды, различные низкомолекулярные соединения и др. Каждая ячейка биочипа служит своего рода отдельной

«нанопробиркой», где иммобилизованный зонд распознает в анализируемом образце только свою мишень. Таким образом удается проводить параллельное распознавание сразу множества мишеней, например, генов, ответственных за лекарственную устойчивость возбудителя болезни.

Принципиальное отличие технологии матричных биочипов, разработанной в ИМБ РАН, в том, что зонды располагаются не на плоской подложке, а в заполимеризованных «каплях» гидрогеля полусферической формы. Размещение молекулярных зондов в трехмерном объеме, а не на плоскости, дает ряд существенных преимуществ. Оно позволяет в десятки и сотни раз увеличить емкость биочипа на единицу поверхности и, соответственно, чувствительность измерений. Кроме того, гель – насыщенное водой желеобразное вещество, исключает возможность взаимодействия зондов друг с другом и с твердой поверхностью подложки, а также обеспечивает отличную изоляцию отдельных ячеек на биочипе.

Робот переносит капли раствора на поверхность активированной подложки

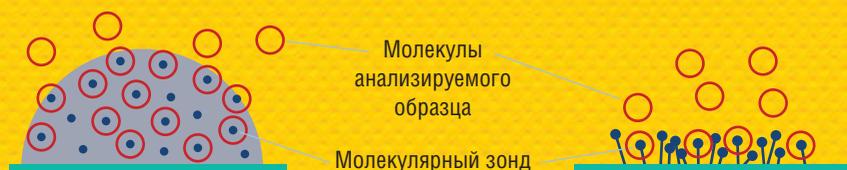


Анализатор биочипов состоит из оптико-электронного блока, системы лазеров для возбуждения флуоресценции и оптической части, совмещенной с CCD-камерой, которая передает изображение чипа на компьютер, где сигналы в каждой ячейке вычисляются и анализируются по определенному алгоритму

Для получения матрицы биочипа растворы молекул зондов смешивают с гелеобразующими добавками. Капли смеси наносят на поверхность полимерной подложки будущего чипа с помощью робота и облучают ультрафиолетовым светом, под действием которого идет полимеризация. В ходе реакции молекулярные зонды присоединяются к растущим полимерным цепям геля и в итоге равномерно распределяются по всему объему ячейки

Объемная ячейка

Поверхностная ячейка



Объемные гидрогелевые 3D-ячейки биочипов имеют ряд преимуществ в сравнении с поверхностными. Например, в гидрогеле иммобилизованные молекулы-зонды, в том числе белки, сохраняют свою активность, а емкость наполнения ячейки зондами в десятки раз выше, чем в «плоских» биочипах

Для регистрации результатов анализа используют флуоресцентные метки, которые вводят в молекулы образца. Если зонд специфично распознает и свяжется с мишенью, в ячейке возникает *флуоресценция*. Интенсивность свечения ячеек биочипа измеряется с помощью специальных аппаратно-программных комплексов-анализаторов, которые и выдают отчет о присутствии в исследуемом образце специфичных молекулярных мишеней, информирующих о наличии микроорганизмов или генных мутаций, онкомаркеров или аллергенов и т. п.

Оригинальная технология создания таких гелевых чипов, разработанная в ИМБ РАН, была запатентована и сертифицирована по европейским стандартам. Биочипы, созданные по этой технологии, занимают отдельную нишу диагностических микроматриц и применяются в российских клиниках. Коммерческие микроматрицы, произведенные ведущими научно-производственными корпорациями Германии и США применяются, в основном, в исследовательских целях.

Туберкулез и лекарственная устойчивость

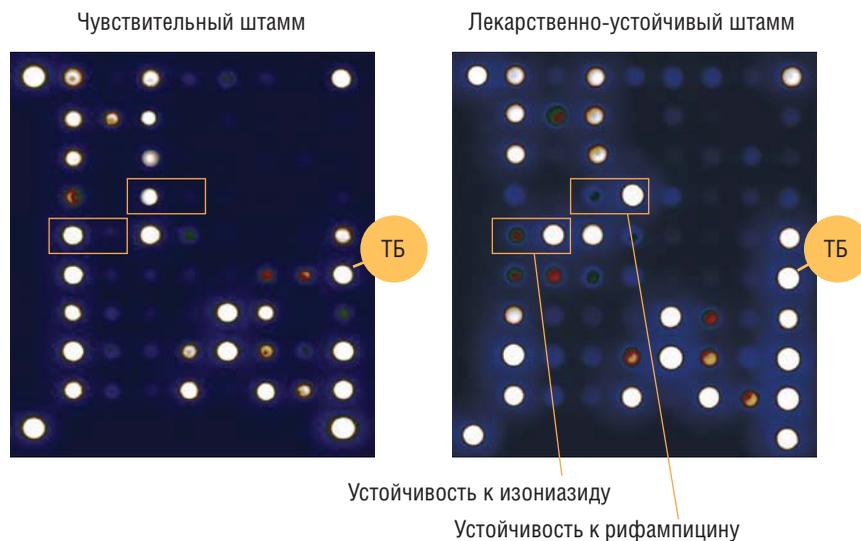
Первой в мире тест-системой на основе биочипов, зарегистрированной для медицинского применения, стал разработанный в ИМБ в 2004 г. набор «ТБ-Биочип-1». С его помощью можно определить наличие в геноме микобактерии туберкулеза 47 мутаций, приводящих к устойчивости к двум основным противотуберкулезным препаратам – *рифампицину* и *изониазиду*.

Почему внимание исследователей привлек именно туберкулез? Дело в том, что многие десятилетия для борьбы с этой болезнью использовали комбинированное лечение сразу несколькими химиопрепаратами,

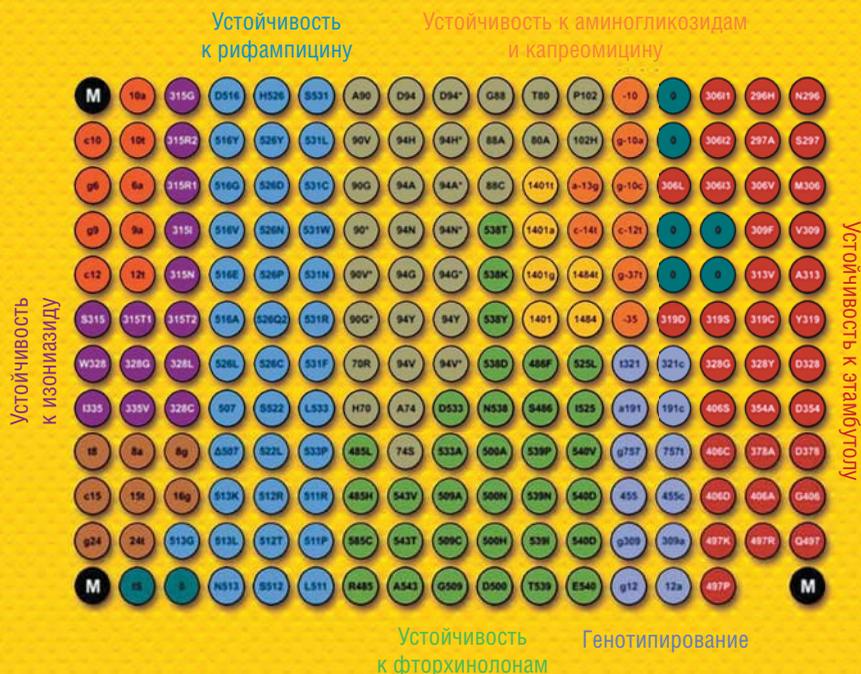
Тест-системами серии «ТБ-Биочип» и оборудованием для их анализа были оснащены 20 учреждений противотуберкулезной службы РФ и 8 бактериологических лабораторий Федеральной службы исполнения наказаний. Число излеченных больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом увеличилось по меньшей мере в 3 раза при ранней постановке диагноза с использованием биочипов в отличие от диагностики традиционными методами (Gryadunov *et al.*, 2011). В этом случае огромную роль играет такой фактор, как время анализа: в первом случае для диагностики достаточно нескольких часов, тогда как выращивание микобактерий на средах с разными противотуберкулезными препаратами занимает 2—3 месяца

чтобы повысить его эффективность. При монотерапии больные быстро приобретали устойчивость к лекарству. Однако такая стратегия привела к тому, что уже в конце прошлого века в мире, в том числе и в России, начал повсеместно распространяться туберкулез со *множественной лекарственной устойчивостью*. Именно этот фактор в наши дни чаще всего является причиной неудачного исхода лечения и возникновения рецидива болезни, от которой ежегодно в мире умирает более 3 млн человек.

Изониазид и рифампицин относятся к популярным и наиболее эффективным препаратам первого (основного) ряда. И если выделенный от пациента возбудитель окажется устойчивым к этим лекарствам, нужно обращаться к химиопрепаратам второго (резервного) ряда, к которым будет чувствительна эта бактериальная популяция. Сегодня одними из наиболее перспективных препаратов для лечения таких форм туберкулеза являются



Пример определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза к основным противотуберкулезным препаратам с помощью биочипа. Слева – флуоресцентная картина, свидетельствующая о чувствительности к стандартной терапии; справа – о наличии мутаций в ДНК, придающих возбудителю устойчивость к рифампицину и изониазиду, что требует перевода на схему лечения резервными препаратами. Свечение ячейки «ТБ» говорит о присутствии последовательности IS6110, однозначно свидетельствующей о принадлежности анализируемой ДНК возбудителю туберкулеза



Флуоресцентная картина при анализе ДНК возбудителя туберкулеза особо опасного генотипа Beijing B0/W148, устойчивого ко всем противотуберкулезным препаратам. Красные точки – ячейки, по которым проведена идентификация мутаций

фторхинолоны. Поэтому следующей тест-системой в ряду диагностических тестов ИМБ стал «ТБ-Биочип-2», с помощью которого можно выявить лекарственную устойчивость к различным классам этих препаратов (Грядунов и др., 2009).

Все более широкое распространение форм туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью явилось стимулом для дальнейшей «эволюции» тест-системы. Требовалось, во-первых, максимально охватить весь спектр генетически детерминированной резистентности к широкому ряду противотуберкулезных препаратов. Во-вторых, возникла необходимость определять генотип и соответственно принадлежность выделенного штамма к основным семействам, циркулирующим на территории РФ, что важно не только для эпидемиологического мониторинга структуры популяции возбудителей туберкулеза, но и для назначения адекватной терапии.

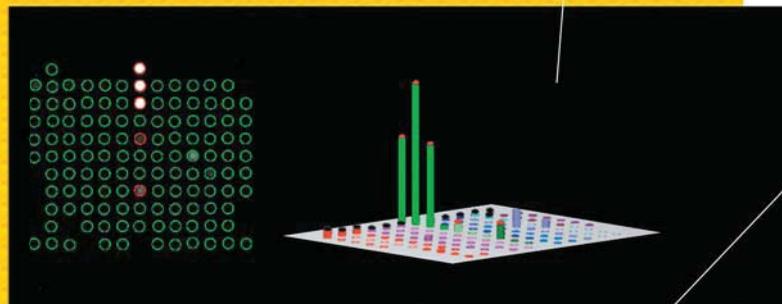
Так в 2012–2013 гг. в результате масштабных геномных исследований был создан не имеющий мировых аналогов набор реагентов «ТБ-ТЕСТ», позволяющий одновременно идентифицировать 120 генетических

На структуре биочипа системы «ТБ-ТЕСТ» (слева) разными цветами отмечены группы ячеек с иммобилизованными в них олигонуклеотидными зондами, специфичными к вариантам генов, связанных с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда

локусов, отвечающих за развитие устойчивости к препаратам первой и второй «линии обороны»: рифампицину, изоиазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам (амикацину и капреомину) (Zimenkov *et al.*, 2016). Такая диагностика позволяет дифференцированно назначать высокие дозы химиопрепаратов или, напротив, удалять те или иные лекарства из схем терапии.

Чтобы получить государственную регистрацию в Росздравнадзоре, тест-система прошла все виды испытаний и экспертиз и с 2014 г. разрешена к применению в медицинской практике РФ. В настоящее время «ТБ-ТЕСТ» приходит на смену набору «ТБ-Биочип».





Идентифицирован генотип 3 вируса гепатита С, подтип 3а

Тест-система «HCV-Биочип» используется для идентификации 6 генотипов и 36 подтипов вируса гепатита С на основе анализа региона NS5B вирусного генома. Справа – гибридационная картина анализа конкретного образца и его интерпретация

От гепатита до рака и аллергий

Еще одной актуальной проблемой мирового здравоохранения является лечение больных гепатитом С. Возбудитель этого вирусного заболевания может долгое время размножаться в печени, ничем не выдавая себя, а первые признаки болезни обнаруживаются лишь спустя пару месяцев после заражения. Еще недавно гепатит С считался практически неизлечимой болезнью, а основным терапевтическим средством служила комбинация из *интерферона* и *рибавирина*, которая зачастую оказывалась неэффективной и имела много негативных побочных эффектов.

Сегодня созданы новые противовирусные препараты, обладающие так называемым *прямым противовирусным действием* и блокирующие ключевые внутриклеточные этапы размножения возбудителя. Но вся сложность в том, что вирус гепатита С имеет 7 вариантов генотипа, при этом каждый генотип имеет еще несколько подтипов. Более того, разные генотипы/подтипы обладают и разной чувствительностью к традиционным и новым препаратам, и выбор противовирусной терапии должен проводиться в соответствии с генотипическими особенностями возбудителя.

В ИМБ РАН совместно с лабораторией вирусологии госпиталя Университета г. Тулузы (Франция) был разработан и запатентован не имеющий мировых аналогов подход, основанный на использовании платформы гидрогелевых биочипов для типирования вируса гепатита С на основе анализа области NS5B вирусного генома. Тест-система «HCV-БИОЧИП», способная

определять 6 генотипов и 36 подтипов этого вируса, успешно прошла клинические испытания в России и Франции (Gryadunov *et al.*, 2011).

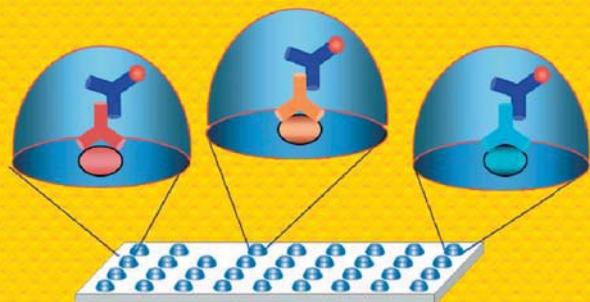
Важнейшим направлением приложения технологии гидрогелевых биочипов служит анализ мутаций и полиморфизмов ДНК самого человека: ДНК-маркеров, ассоциированных с возникновением различных неинфекционных заболеваний.

Среди онкологических заболеваний у детей ведущее место занимают лейкозы. Тест-система «ЛК-БИОЧИП» способна идентифицировать в образцах крови 13 наиболее клинически значимых *хромосомных транслокаций* (переносов фрагмента одной хромосомы на другую), характерных для некоторых типов острых и хронических лейкозов. Каждая из этих транслокаций определяет свой вариант развития лейкоза и важна для выбора стратегии лечения. Эта тест-система применяется в Национальном научно-практическом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (Москва), где анализируются образцы из 18 региональных гематологических центров РФ (Gryadunov *et al.*, 2011).

Для ранней диагностики рака молочной железы и яичников создана тест-система «РМЖ-БИОЧИП», которая позволяет определять мутации в генах BRCA1/2, ассоциированные с высокой (до 80%) вероятностью возникновения наследственных форм этих заболеваний.

В настоящее время в ИМБ РАН разрабатываются варианты тест-систем на основе биочипов для определения чувствительности злокачественных клеток к противоопухолевой терапии. Например, с помощью биочипа

Гидрогелевые микроячейки

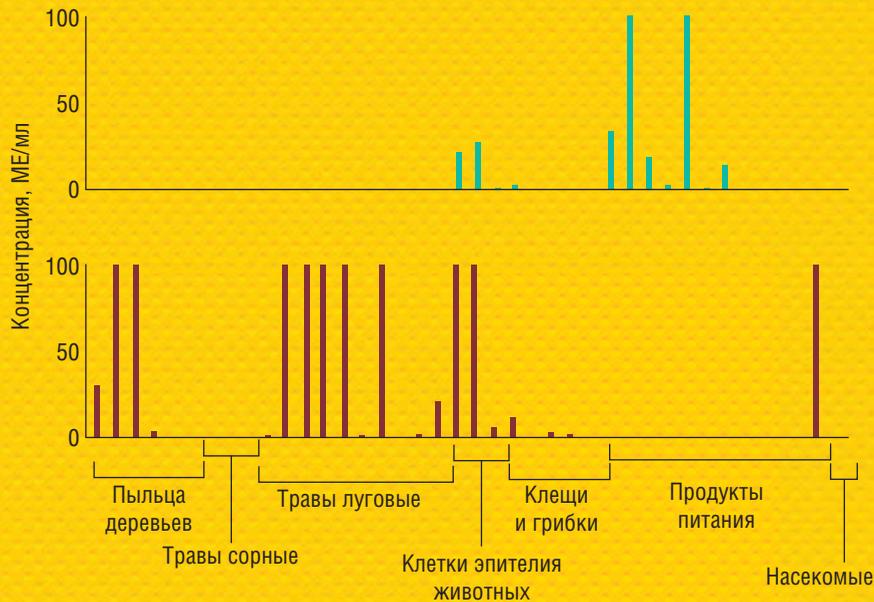
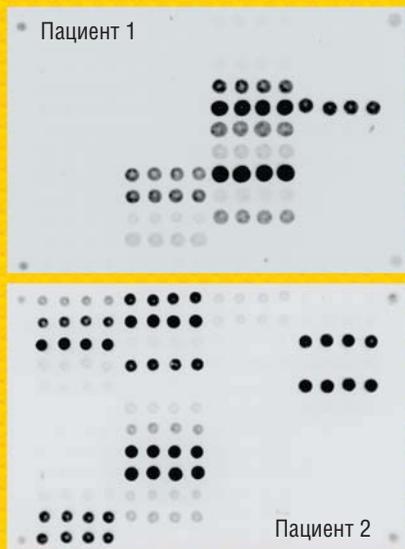


Биочип



В ячейках «АЛЛЕРГО-БИОЧИП» в качестве молекулярных зондов иммобилизованы экстракты 60 аллергенов, наиболее часто встречающихся в европейской части РФ. При проведении анализа сыворотку крови наносят на биочип и инкубируют, в результате чего образуются специфические комплексы антител с аллергенами. Для визуализации биочип обрабатывают вторичными флуоресцентно мечеными антителами, специфичными к антителам человека, а затем проводят регистрацию и обсчет сигналов от каждой ячейки и определяют концентрации комплексов с IgE по калибровочным кривым

Внизу – примеры изображений флуоресцентных картин и соответствующие профили концентраций, полученные при анализе образцов сывороток крови двух пациентов



для индивидуального подбора препаратов, эффективно воздействующих на молекулярные мишени в опухолевых клетках меланомы, можно выявить мутации генов, которые определяют целесообразность использования таких препаратов *таргетной* («молекулярно-прицельной») терапии поздних стадий и рецидивов меланомы, как *траметиниб*, *иматиниб* и *вемурафениб* (Emelyanova *et al.*, 2017).

Трехмерная структура гидрогеля, в котором на биочипах зафиксированы молекулярные зонды, позволяет

сохранить без изменений достаточно «чувствительную» нативную структуру белковых молекул. Поэтому такие биочипы можно использовать также для исследования белок-белковых взаимодействий, что требуется, к примеру, при проведении различных видов иммунохимического анализа.

В ИМБ РАН удалось перевести такой классический анализ в формат микрочипа и адаптировать его для диагностики аллергических заболеваний. Совместно с германской биотехнологической компанией *Dr. Foote*

Laboratorien GmbH, предоставившей наборы природных и рекомбинантных аллергенов, была разработана и запатентована тест-система «АЛЛЕРГО-БИОЧИП» для параллельного количественного определения больших панелей аллерген-специфических антител E и G4 в сыворотке крови (Feyzkhanova *et al.*, 2017).

Важно, что для анализа антител на 30 и более аллергенов на биочипе требуется очень небольшой (всего 60 мкл) объем сыворотки крови – ровно столько, сколько требуется для анализа на один аллерген традиционным иммуноферментным методом! Такое отличие особенно значимо в педиатрии. Лабораторный вариант этой тест-системы уже проходит доклинические испытания в Детской городской клинической больнице № 13 им. Н. Ф. Филатова (Москва).

Двенадцать специализированных тест-систем, созданных на основе технологии гидрогелевых биочипов в ИМБ РАН, получили разрешение к применению как медицинские изделия для лабораторной диагностики. Эти тест-системы успешно используются более чем в 50 научно-исследовательских и медицинских центрах РФ, стран СНГ и ЕС.

Технологии биочипов, разработанные в ИМБ РАН, защищены 42 отечественными и международными патентами. И эти технологии продолжают интенсивно развиваться. Разрабатываются новые подходы, позволяющие упростить и ускорить методики, интегрировать в единую процедуру все стадии проведения анализа: от обработки биологического образца до количественной идентификации в режиме реального времени.

Ядро системы – гидрогелевый биочип – будет в дальнейшем модифицироваться в зависимости от назначения диагностического теста, в то время как остальные компоненты уже сейчас являются унифицированными. Такие «лаборатории на чипе» позволят значительно улучшить качество лабораторной диагностики, снизить вероятность заражения медперсонала и в конечном счете повысить эффективность и сократить стоимость лечения.

Литература

Грядун Д. А., Зименков Д. В., Михайлович В. М. и др. *Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике // Медицинский алфавит. 2009. № 3. С. 10–14.*

Заседателев А. С. *Биологические микрочипы для медицинской диагностики // Наука и технологии в промышленности. 2005. № 1. С. 18–19.*

Колчинский А. М., Грядун Д. А., Лысов Ю. П. и др. *Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы // Молекулярная биология. 2004. Е. 38 № 1. С. 5–16.*



Выдающийся молекулярный биолог, академик А. Д. Мирзабеков в лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН (Москва)

Arenkov P., Kukhtin A., Gemell A., *et al.* *Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions // Analytical Biochemistry. 2000. V. 278. N. 2. P. 123–131.*

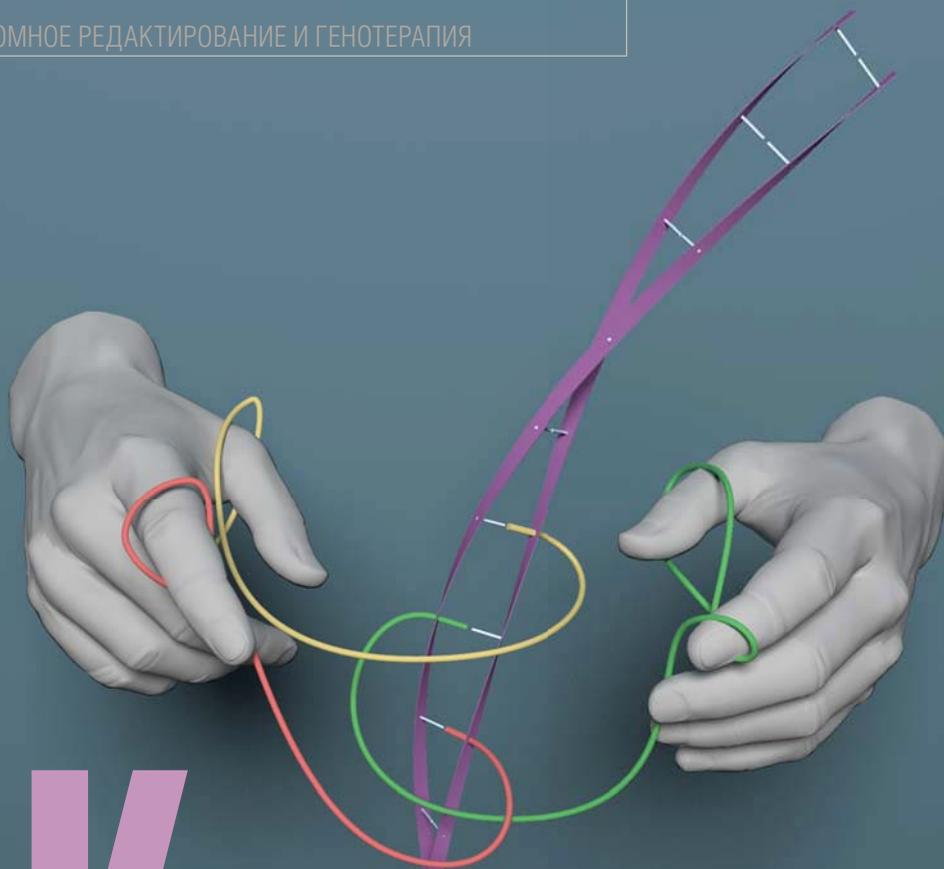
Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I. *et al.* *Detection of BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 and MAP2K1/2 mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis // Oncotarget. 2017. V. 32. N. 8. P. 52304–52320.*

Feyzkhanova G., Voloshin S., Smoldovskaya O. *et al.* *Development of a microarray-based method for allergen-specific IgE and IgG4 detection // Clinical proteomics. 2017. doi: 10.1186/s12014-016-9136-7.*

Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V. *et al.* *Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia // Expert review of molecular diagnostics. 2011. N. 11 P. 839–853.*

Khrapko K. R., Lysov Yu. P., Khorlyn A. A. *An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing // FEBS Letters. 1989. V. 256. N. 1-2. P. 118–122.*

Zimenkov D. V., Kulagina E. V., Antonova O. V., *et al.* *Simultaneous drug resistance detection and genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a low-density hydrogel microarray // Journal of antimicrobial chemotherapy. 2016. V. 71. N. 6. P. 1520–1531.*



Как писать и переписывать партитуру ДНК

Кроме обычного текста ДНК, записываемого четырьмя буквами А, Г, Т и Ц, наш геном содержит множество инструкций, каким образом этот текст читать, чтобы получилось что-то осмысленное. Сейчас исследователи не только понимают механизм записи этих инструкций, но и изобретают способы их перезаписи для регуляции клеточных процессов

Всех самых честных правил, когда не в шутку занемог он уважать себя заставили, лучше выдумать немог его пример, другим наука невозможна, как бы она ни казалась абсурдом, сидеть в день и ночь неотходя ни шагу прочь, как онеиз...

Конечно, каждый ходивший на школьные уроки литературы, узнает в этой длинной последовательности букв начало «Евгения Онегина». Но, боже мой, какой нелегкой была бы задача прочитать весь пушкинский роман без пробелов, точек и запятых, разбиения на строки и строфы! А если нужно не просто прочитать, а прочитать вслух и с выражением? И не знакомый со школы текст, а совершенно новый? А если стоит задача найти в этом тексте рифмы или определить стихотворный размер?

Здесь играть, здесь не играть, здесь рыбу заворачивали

Первые виды письменности в истории примерно так и выглядели. Несколько тысяч лет потребовалось людям, чтобы дойти до современных, привычных нам видов оформления речи на письме. И это еще не самая сложная ситуация, когда записанный текст требует пояснений для правильного чтения. Кто хоть сколько-нибудь времени посвятил изучению нотной грамоты, помнит диезы и бемоли, крещендо и диминуэндо и массу других специальных знаков, без которых записанные ноты невозможно сыграть так, чтобы получился Вивальди или Моцарт. «Здесь играть, здесь не играть, здесь рыбу заворачивали» – пересмотрите замечательную миниатюру В. Винокура и Л. Оганезова, там это очень хорошо объяснено.

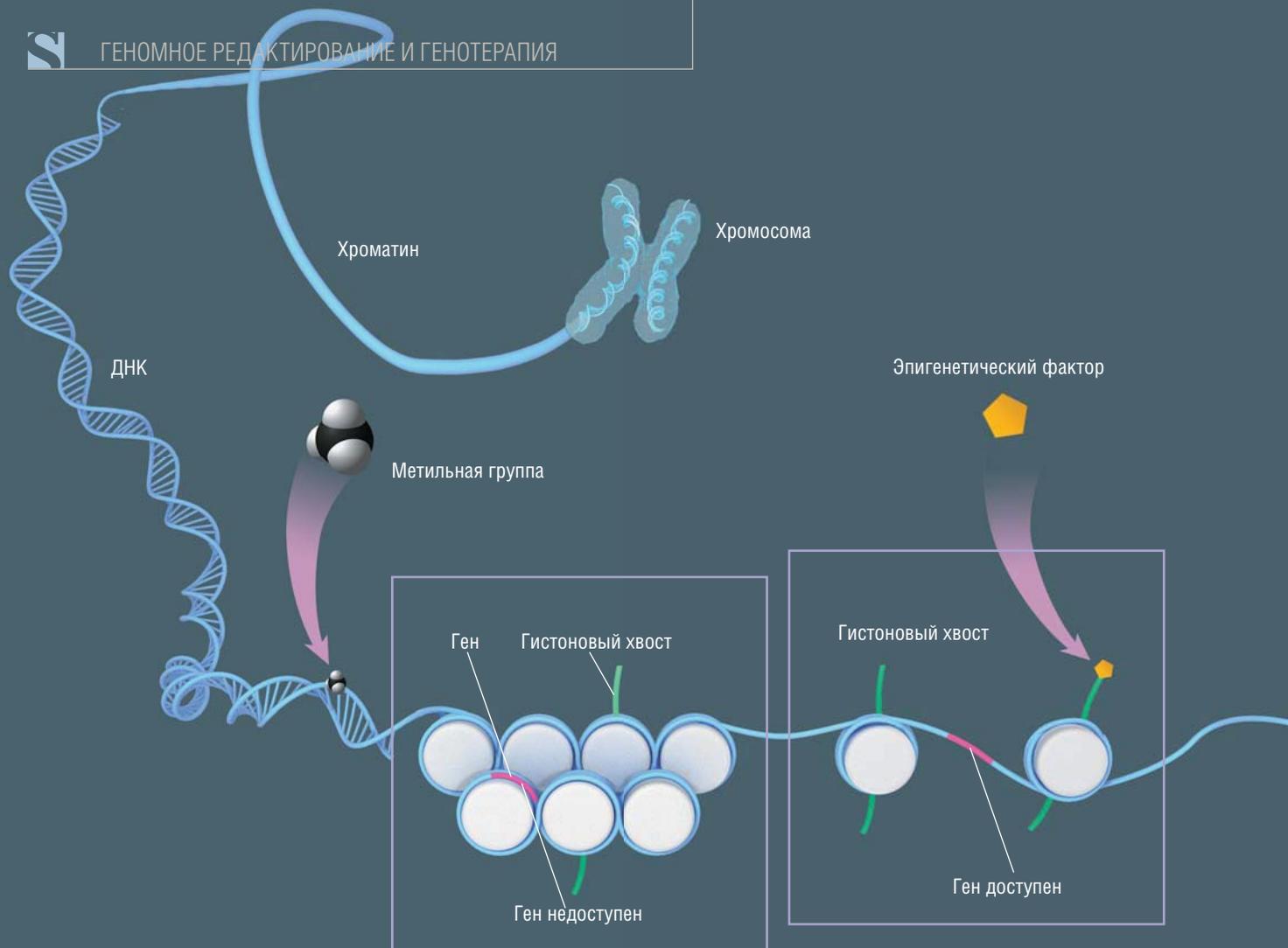


ЖАРКОВ Дмитрий Олегович – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск); профессор кафедры молекулярной биологии и заведующий лабораторией белковой инженерии Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор 105 научных работ и 1 патента

Все сказанное имеет самое непосредственное отношение и к биологии. В каждой клетке нашего тела находится длинный «текст» ДНК, состоящий примерно из 6 млрд чередующихся «букв» А, Г, Т и Ц. В этом тексте записаны все инструкции по построению любой клетки человеческого организма. Так почему же, если текст везде одинаковый, в мозге по его инструкциям получаются нейроны, в печени – гепатоциты, а некоторые незаконопослушные клетки ухитряются стать раковыми? Ответ на поставленный вопрос краток и очень сложен. В каждой клетке, помимо текста ДНК, есть инструкции, как этот текст читать. Они могут быть записаны и в самой ДНК, и в белках, которые с ней связываются в клеточном ядре. А вот как эти инструкции работают – проблема настолько обширная и малоопытная, что в современной биологии считается одной

Ключевые слова: эпигенетика, геномное редактирование, метилирование ДНК, 5-метилцитозин, повреждение ДНК, репарация ДНК.

Key words: epigenetics, genome editing, DNA methylation, 5-methylcytosine, DNA damage, DNA repair



Известно два способа эпигенетической регуляции активности генов. Один из них основан на внесении модификаций в белки гистоны, на которые, как на катушку, намотана ДНК в ядре клетки. Чем плотнее упаковка в катушке, тем ДНК менее доступна для ферментов, синтезирующих РНК с матрицы ДНК, т. е. гены в области плотной упаковки будут неактивны. Эпигенетическая модификация гистонов может способствовать более свободному расположению «катушек», в результате чего ферменты получают доступ к этому участку ДНК, и РНК, а затем и белок, закодированный в генах, могут синтезироваться. Другой способ эпигенетической регуляции – метилирование, присоединение к ДНК метильной группы, в результате чего азотистое основание цитозин превращается в 5-метилцитозин. Наличие метильной группы, так же как и модификация гистонов, в итоге меняет плотность упаковки ДНК и доступность генов для ферментов

из главных. Если последовательностями из четырех букв занимаются традиционная и молекулярная генетика, то инструкции – предмет отдельной дисциплины, *эпигенетики*, или «окологенетики», если частично перевести с греческого.

То, что мы сейчас знаем о наследовании генов и признаков организмов, во многом является следствием революции в молекулярной биологии, которая произошла в середине XX в. благодаря трудам Дж. Уотсона, Ф. Крика и десятков их коллег, чьи портреты украшают ныне

учебники и сайт Нобелевской премии. Уже в то время стало ясно, что даже наследуемые признаки не всегда полностью определяются последовательностью нуклеотидов ДНК в геноме клетки или организма.

Например, в 50-х гг. прошлого века канадский генетик А. Бринк, работая с кукурузой, открыл явление, которое назвал *парамутацией*. Он брал растения с двумя разными аллелями гена *red1*, отвечающего за синтез пигмента и придающего зернам красную окраску. Один из этих аллелей дает темно-красные зерна, другой – более

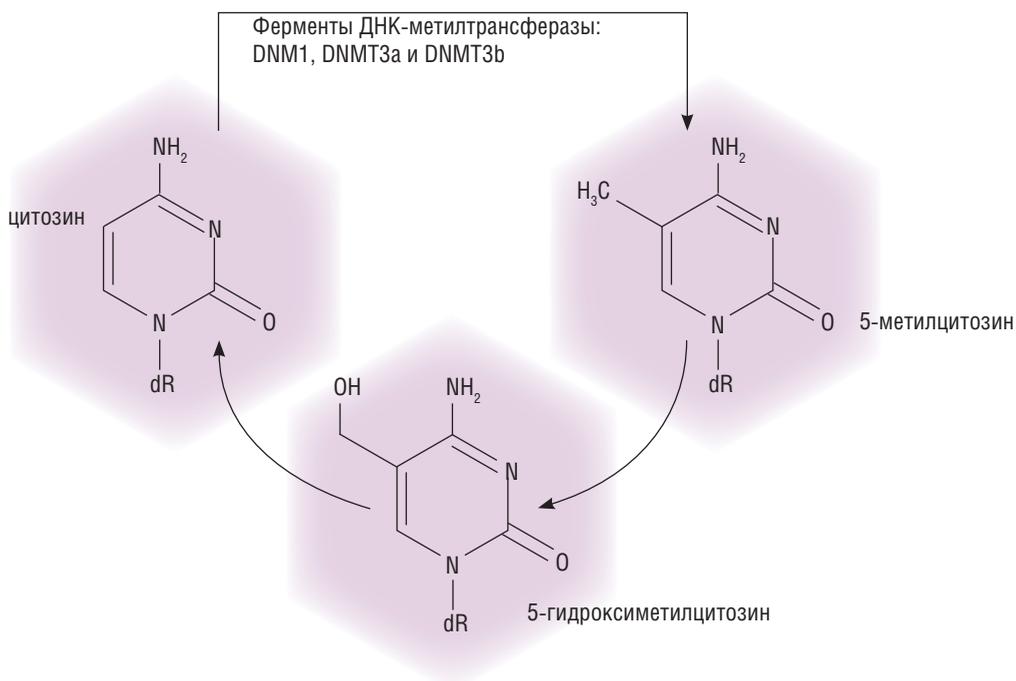
светлые. Побывав вместе со светло-красным аллелем в одном растении, темно-красный тоже становился светлым, не меняя при этом, однако, своей нуклеотидной последовательности. В итоге этих и многих других экспериментов возникло понятие о существовании двух взаимодополняющих систем наследственности: генетической, которая основана на последовательности нуклеотидов, и эпигенетической, основанной на стабильной активации и инактивации генов.

Парадоксально, но, несмотря на огромное и все возрастающее число публикаций, посвященных эпигенетике (база данных *PubMed* на момент написания статьи насчитывала 64898), единое определение этого понятия отсутствует. Некоторые ученые вслед за английским генетиком и эмбриологом К. Уоддингтоном понимают под эпигенетикой все, что происходит в организме при «реализации» генотипа – его проявлении во внешних признаках (*фенотипе*) в конкретных условиях среды. Другие специалисты, опираясь на авторитет не менее известных генетиков А. Риггса, Р. Холлидея и Дж. Мэйнард-Смита, более узко трактуют эпигенетику как

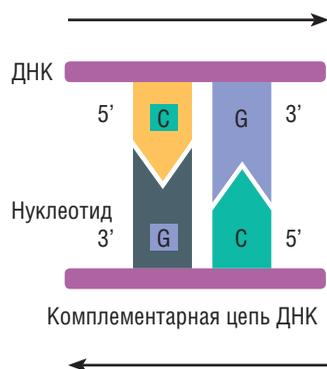
наследование признаков, не связанных с различиями в последовательности ДНК. В любом случае до недавнего времени считалось, что эпигенетические механизмы отвечают за передачу информации дочерним клеткам о состоянии материнской клетки при ее делении, но лишь в исключительных случаях они задействованы в передаче информации из поколения в поколение у многоклеточных организмов.

Хороший, плохой, нейтральный

Сейчас известны два основных способа эпигенетической регуляции активности генов у животных и растений. Один из них основан на внесении модификаций в белки гистоны, образующие *нуклеосомы* – «катушки», на которые намотана ДНК в ядре клетки. Чем плотнее упакованы ДНК-белковые катушки в так называемый *хроматин*, тем меньше доступ к ДНК для ферментов, ведущих *транскрипцию* – синтез РНК по матрице ДНК. А чем меньше РНК – тем меньше белка производится, меньше активность гена.



Специальные ферменты ДНК-метилтрансферазы (метилазы) DNMT1, DNMT3a и DNMT3b узнают CpG-динуклеотиды, последовательно стоящие цитозин и гуанин, и снабжают их метильной группой. В результате образуется подавляющий активность генов 5-метилцитозин. Далее это основание может с помощью белков ТЕТ превратиться в 5-гидроксиметилцитозин, наоборот, способствующий активации генов. И, наконец, в процессе дальнейших превращений, тоже опосредованных клеточными ферментами, основание может вновь превратиться в обычный цитозин



Метилаза DNMT1

www.enzymologic.com

СрG-динуклеотид относится к палиндромным последовательностям: он читается одинаково в обоих направлениях по комплементарным цепям ДНК. Одиночная нить ДНК представляет собой полимер – «бусы», состоящие из 4-х видов бусинок-нуклеотидов: аденина (А), тимина (Т), гуанина (G) и цитозина (С). Две нити ДНК удерживаются вместе за счет взаимодействий между парами нуклеотидов, подходящих друг другу, как ключ к замку: А – к Т, G – к С. Метилцитозин, таким образом, в СрG-динуклеотиде два, и после репликации (удвоения) ДНК в процессе деления клетки «новый» нужно опять метилировать. Этим занимается метилаза DNMT1

Второй же способ основан на использовании особого основания ДНК – 5-метилцитозина. От обычного цитозина он отличается наличием дополнительной метильной группы, чем становится несколько более похож на *тимин* – одно из обычных оснований ДНК. Но такие метилированные цитозины могут возникать не где угодно, а только если вслед за цитозином сразу стоит *гуанин*. Такие последовательности называются *СрG-динуклеотидами*. Если их в ДНК соберется много и близко друг к другу – получаются СрG-островки, чаще всего встречающиеся в районах *промоторов* – участков генов, с которых начинается их «чтение», т. е. транскрипция.

Обычно в нормальных клетках большинство СрG-динуклеотидов в геноме человека метилировано, а вот в островках, напротив, метилцитозин встречается редко. Зато во многих раковых клетках это распределение нарушено: островки больше метилированы, а остальные СрG-динуклеотиды – меньше. На самом деле метилцитозина в клетках так много, что иногда его даже называют «пятым основанием ДНК».

Каким же образом наличие 5-метилцитозина в ДНК влияет на активность генов? Своими кодирующими свойствами он от обычного цитозина ничем не отличается и прекрасно «прочитывается» при транскрипции. Зато метилцитозины, а точнее метилированные СрG-динуклеотиды, узнаются белками, содержащими так называемые *метилсвязывающие домены* (участки). После связывания с метилированной ДНК они

привлекают другие белки, которые более плотно упаковывают хроматин, а это, как уже говорилось, мешает транскрипции.

До недавнего времени в этом механизме все казалось более-менее понятно: цитозин – «хороший», способствует активности генов, метилцитозин – «плохой», ее подавляет. Но такие простые сценарии природе, как правило, не нравятся. Недавно была обнаружена «шестая буква» ДНК – 5-гидроксиметилцитозин, об истории открытия которого мы поговорим чуть позже. К метильной группе у него добавлена еще гидроксильная, и это сильно отличает его от метилцитозина с точки зрения клетки: он узнается не теми же белками, что метилцитозин, а совершенно другими, которые не конденсируют хроматин, а, наоборот, делают его менее плотным. Так что в качестве «супермена» для повышения активности генов выступает именно гидроксиметилцитозин, а простой цитозин держит нейтралитет в этой вечной битве.

Пишем, стираем, пишем, стираем, пишем...

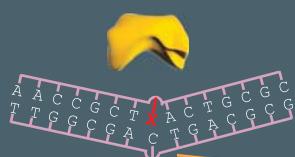
Любой сигнал на то и сигнал, что его можно включить и выключить, подать и отменить. Разумеется, если существуют специальные основания ДНК, меняющие активность генов, то один из главных вопросов – откуда они в ДНК появляются и куда потом пропадают?

ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

Окисленные, метилированные и дезаминированные основания



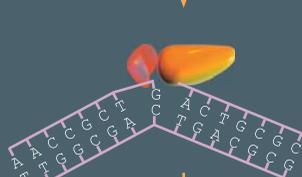
ДНК-гликозилаза находит и удаляет повреждение



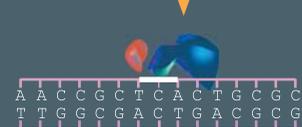
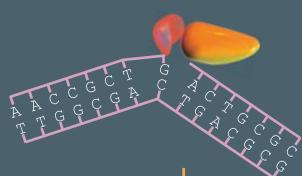
Эндонуклеаза АРЕХ1 расщепляет нить ДНК



Вспомогательный белок XRCC1

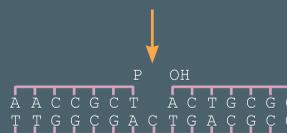


Застраивание бреши в нити ДНК



ДНК-лигазы сшивают нить ДНК

Одноцепочечный разрыв под действием рентгеновского излучения

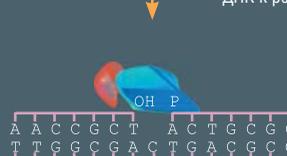


Фермент PARP1 распознает повреждение

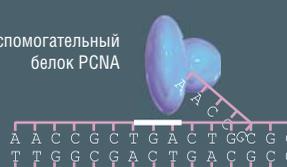
Вспомогательный белок XRCC1



Подготовка концов ДНК к репарации



Фермент FEN1 удаляет кусочек старой нити ДНК



Вспомогательный белок PCNA

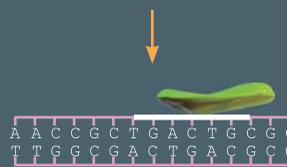
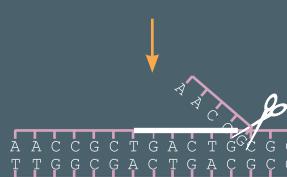
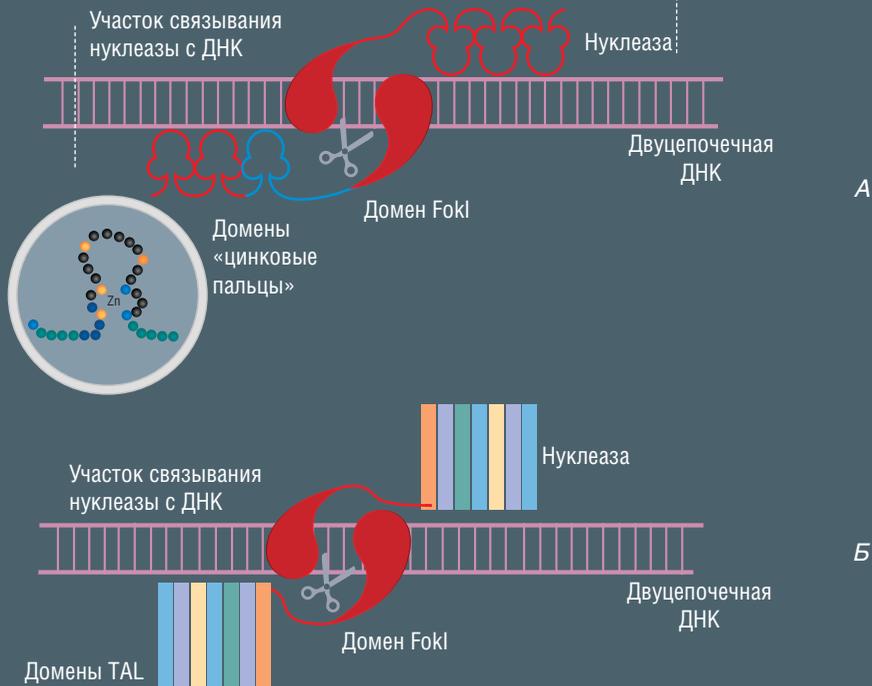


Схема эксцизионной репарации азотистых оснований белковыми комплексами, специализирующимися на «мелком» ремонте небольших повреждений оснований ДНК, не сопровождающихся значительным искажением двойной спирали. Такой конвейер ферментов репарации не только исправляет спонтанные повреждения, но и идеально приспособлен для того, чтобы удалять из ДНК какие угодно модифицированные основания. По: (Ходырева, Лаврик, 2007)



В настоящее время существует три главные системы нацеливания на нужное место в геноме для его редактирования. Первая основана на белковых модулях «цинковые пальцы» фермента zinc-finger (А). Каждый «цинковый палец» этой нуклеазы способен «узнать» и специфично связаться с определенной последовательностью ДНК из трех нуклеотидов. Вторая, похожая система основана на белках TAL-эффекторы (Б). Каждый из белковых доменов TAL узнает один нуклеотид ДНК. Обе нуклеазы для «разрезания» ДНК используют нуклеазный домен FokI.

Самая популярная система редактирования генома CRISPR/Cas9 (В) в качестве структур, узнающих ДНК, использует короткие РНК. Идея создания такой системы родилась при изучении механизмов, которые бактерии используют для защиты от своих патогенных вирусов (бактериофагов). Основой системы является комплекс из белка Cas9, способного разрезать нить ДНК, и направляющей РНК, которая может распознавать и связываться с определенным участком ДНК-мишени

С метилцитозином все стало понятно достаточно давно. Еще лет тридцать назад в клетках человека были обнаружены ферменты *ДНК-метилтрансферазы*, или *метилазы*, которых сейчас известно три – DNMT1, DNMT3a и DNMT3b. Они узнают CpG-динуклеотиды и снабжают их метильной группой. Три фермента играют немного разные роли. DNMT1 – «поддерживающая» метилаза. Если присмотреться, CpG-динуклеотид относится к *палиндромным* последовательностям, читающимся одинаково в обоих направлениях по комплементарным цепям. Поэтому метилцитозин там не один, а два, и после *репликации* – копирования ДНК при делении клетки – нужно опять метилировать свеженький, только что встроенный в новую цепь ДНК цитозин, чем и занимается метилаза DNMT1. В отличие от последней, DNMT3a и DNMT3b могут метилировать ДНК «с нуля», даже если в ней еще нет метилцитозина. Внимательный читатель может спросить: а где же DNMT2? Есть такой белок, только он метилирует не ДНК, а РНК, и мы о нем говорить не будем.

Знакомство с белками, метилирующими ДНК, мы закончим упоминанием о том, что они существуют и у бактерий. Эпигенетической регуляции с участием 5-метилцитозина бактерии не изобрели, зато у них есть так называемые системы *рестрикции-модификации*, которые защищают их от вирусов. В бактериальной клетке, как правило, имеются ферменты-*рестриктазы*, разрезающие ДНК по определенным последовательностям, и метилазы, узнающие и метилирующие эти последовательности. Если в клетку попадает вирус, его ДНК разрезается, а бактериальная ДНК от этого защищена метилированием.

Разнообразие способов узнавания последовательностей и видов метилирования в мире бактерий велико, но некоторые из микроорганизмов, например *спирилла* (симбиотический микроб, живущий в кишечнике насекомых), используют именно 5-метилцитозин в CpG-динуклеотидах. За это их очень любят ученые, поскольку в экспериментальных целях метилазу M.SssI из спириллы использовать не в пример легче, чем человеческие белки.

История со стиранием эпигенетических меток гораздо более запутанная. Долгое время полагалось, что клетка вообще этого не делает, а просто прекращает поддерживающее метилирование в каком-то месте генома, и через несколько клеточных делений большая часть потомков клетки не будет содержать метилцитозин в этом месте. Однако многие клетки в организме человека не делятся вообще, а убирать метильные метки способны. В других же случаях метилцитозин

убирается из ДНК гораздо быстрее, чем позволяет клеточное деление. Поэтому когда наконец открыли систему активного деметилирования, все причастные к эпигенетике исследователи облегченно вздохнули. А механизм оказался крайне интересным.

Сами ломаем, сами чиним

О системе *репарации ДНК* «Наука из первых рук» писала неоднократно (Жарков, 2006; Ходырева, Лаврик, 2007; Жарков, 2009; Сидоренко, Гроллман, Жарков, 2013; Косова, Ходырева, Лаврик, 2013). Эта система помогает нам выживать, несмотря на десятки тысяч повреждений ДНК, которые каждая клетка нашего организма испытывает ежедневно как под влиянием внешних причин (ультрафиолетовые солнечные лучи, радиация, поступающие в организм токсины), так и за счет неизбежных биохимических процессов (главные «злодеи» тут – кислород и вода).

Самый важный из путей репарации, *эксцизионная репарация оснований*, начинается с того, что поврежденное основание узнается и вырезается из ДНК одним из ферментов, относящихся к классу ДНК-гликозилаз. Далее последовательно действуют еще несколько белков, и в результате на место поврежденной «буквы» ДНК встает нормальная.

Обычно про репарацию вспоминают именно в контексте борьбы с повреждениями ДНК, мутациями и раком. Однако несложно заметить, что такой конвейер ферментов идеально приспособлен для того, чтобы удалять из ДНК какие угодно модифицированные основания, а не только спонтанные повреждения. Инженер, перед которым была бы поставлена задача изобрести систему, удаляющую из ДНК метилцитозин, долго бы не думал: конечно, нужно сконструировать ДНК-гликозилазу, его вырезающую, а дальше репарация сама заделает дырку обычным цитозином. И инженер был бы не совсем неправ: именно по такому пути пошли растения, у которых тоже есть эпигенетическая система, использующая 5-метилцитозин.

Но у животных все организовано сложнее, и это лишний раз напоминает нам о различиях между инженером, активно использующим имеющуюся на плечах голову, и эволюцией, работающей по принципу «получилось бы хоть как-нибудь, а потом само усовершенствуется». Сначала метильная группа 5-метилцитозина окисляется одним из белков ТЕТ (их у человека три). При этом получается тот самый 5-гидроксиметилцитозин, который активирует гены. Если нам надо переключить ген из неактивного состояния в активное, мы достигли цели.

А если нужно восстановить нейтральное состояние с цитозином, то ту же метильную группу можно окислить еще в два шага с образованием 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина. Последние уже не активирующие и не ингибирующие и воспринимаются системой репарации как повреждения, которые она исправляет, в результате чего образуется цитозин. Заодно можно удалить аминогруппу бывшего метилцитозина и поменять ее на *кетогруппу* (проще – на атом кислорода). Этим занимаются несколько специальных ферментов-*дезаминаз*, и это тоже повреждение, которое удалит система репарации.

Можно сказать, что последние исследования в области эпигенетики изменили наш взгляд на ДНК. Школьная картина с четырьмя буквами сейчас представляется очень упрощенной: клетка для регуляции активности генов постоянно активно заменяет многие из этих букв на другие, не входящие в этот короткий алфавит. Уже сейчас ясно, что метилцитозином и гидроксиметилцитозином дело не ограничивается, и известны примеры, когда основания, ранее считавшиеся повреждениями, выполняют полезную функцию. Например, клетки нашей иммунной системы активно повреждают гены, кодирующие антитела – это помогает им быстро мутировать и перебирать много вариантов антител в поисках тех, которые будут узнавать вторгающиеся в наш организм патогены. Иногда специально поломать, а потом починить – очень эффективная стратегия замены старого на новое.

Подкрутить в нужном месте

Итак, мы знаем, как клетки ставят в ДНК и стирают из нее эпигенетические метки. Можем ли мы использовать это в своих интересах? Выключить активный онкоген в раковых клетках или, наоборот, подтолкнуть нужный неработающий ген?

Главный вопрос тут: как нацелить в нужное место генома белок, вводящий или стирающий эпигенетические модификации? И как раз в области такого нацеливания в последние годы произошла еще одна революция в биологии, которая сулит настолько большие перспективы в инженерии живых организмов, что сравнить ее можно, пожалуй, только с созданием ньютоновской механики, позволяющей инженерам проектировать прочные мосты и нетонущие корабли. Наш журнал писал и об этих достижениях, объединенных общим названием «геномное редактирование» (Власов, Пышный, Жарков, 2014; Медведев, 2014; Закиян, Власов, Медведев, 2014;), поэтому за деталями читателя мы отсылаем к этим статьям, а здесь упомянем только самое главное.

Сейчас существуют три главные системы нацеливания на нужное место в геноме. Одна основана на *цинковых пальцах*, широко распространенных белковых

мотивах, узнающих небольшие кусочки ДНК. Комбинируя несколько «пальцев» с разными специфичными последовательностями ДНК, можно точно адресовать снабженный ими белок в уникальное место в геноме. По сходному принципу работает и так называемая система TAL-эффекторов, взятая из бактерий *Xanthomonas*, вызывающих многие болезни растений: небольшие участки белка, узнающие одну пару оснований, комбинируют для нацеливания на конкретную последовательность ДНК. Наконец, самая популярная на сегодня система, CRISPR/Cas9, для адресации использует последовательность РНК, соответствующую нужному участку ДНК. Если мы хотим нацелить РНК или белок ее на конкретный участок генома, мы делаем искусственный белок, в котором сочетается адресующий модуль, сконструированный на основе одной из упомянутых систем, и активный модуль, который будет, например, метилировать или деметилировать ДНК.

Справедливости ради стоит сказать, что самые первые попытки адресно воздействовать на метилирование ДНК вообще обходились без белков. Еще в 1990-х гг. в клетки научились вводить олигонуклеотиды – небольшие кусочки ДНК, содержащие метилцитозин в нужном месте, с расчетом на то, что они будут связываться с комплементарной ДНК, а система метилирования с помощью фермента DNMT1 примет это за последствия репликации и вставит в нужном месте ДНК метилцитозин. Это даже получалось, но в целом эффективность процесса была крайне низкой. В 1997 г. ученые наконец нашли первый подход к системам современного вида. В лаборатории Т. Бестора в Колумбийском университете (США) слили вместе адресующий модуль из цинковых пальцев и активный модуль в лице вышеупомянутой бактериальной метилазы M.SssI. Полученная конструкция в пробирке прекрасно метилировала ДНК в нужном месте. В 2003 г. М. Кладде из Техасского университета (США) сделал следующий шаг, испытав аналогичные адресованные гибридные метилазы в живых клетках, а именно в дрожжах, которые своей системы метилирования не имеют

До появления систем адресации исследователи пытались как-то иначе с пользой изменять глобальный статус метилирования генома клеток человека и достигли на этом пути определенных успехов. В клинической онкологии для борьбы с лейкозами применяются лекарства азациитидин и децитабин – это аналоги цитозина, которые не могут быть метилированы, и в злокачественных клетках активируются убивающие их гены. Аналогичные подходы, только с другими лекарствами, используются при лечении серповидноклеточной анемии – заболевания, при котором мутирована одна из белковых цепей гемоглобина. При глобальном деметилировании запускаются гены



фетальных глобинов. В норме у взрослого они уже работать не должны, но их активация помогает больному иметь хоть какой-то функциональный гемоглобин.

После того, как была показана принципиальная возможность нацеленного редактирования эпигенетических меток, новые варианты, использующие всевозможные адресующие и активные модули, посыпались как из ведра. Сейчас с помощью современных систем редактирования генома испытаны практически все известные ферменты систем метилирования и деметилирования. Но остается вопрос: а нужно ли это? Какое значение для клетки может иметь изменение метилирования в одном конкретном месте? Не окажется ли так, что для надежного изменения эпигенетических меток, регулирующих один ген, мы должны будем вводить в клетку десятки и сотни белков с разными адресами?

Пока кажется, что ответы на эти вопросы вполне оптимистичны. Еще эксперименты Кладде показали, что в дрожжах метилируется не только один конкретный участок, к которому адресована гибридная метилаза, но и CpG-динуклеотиды на несколько сотен нуклеотидов вокруг. В дальнейшем и другими группами ученых было показано, что и метилирование, и деметилирование как бы «расползаются» в стороны от места, куда было первоначально нацелено изменение. А в 2014 г., проанализировав огромное количество данных по метилированию и активности генов, международный консорциум, включающий и российских ученых, пришел к выводу о существовании того, что ученые назвали «светофорным метилированием»: примерно для 17% CpG-динуклеотидов есть зависимость активности гена от состояния метилирования одного конкретного CpG.

Так что, похоже, управлять активностью генов вполне реально. Инженерия живых систем получила в свое распоряжение новый мощный инструмент.

Литература

Власов В. В., Пышный Д. В., Жарков Д. О. Приручение древней молекулы // *Наука из первых рук*. 2014. Т. 57/58. №3/4. С. 84–91.

Грин И. Р., Петрова Д. В., Жарков Д. О. Редактирование эпигенетических модификаций ДНК // *Гены и клетки*. 2016. Т. 11. № 2. С. 53–60.

Жарков Д. О. Загадки «ржавой» ДНК // *Наука из первых рук*. 2006. Т. 12. №6. С. 24–35.

Жарков Д. О. Часовые генома // *Наука из первых рук*. 2009. Т. 28. №4. С. 160–169.

Закиян С. М., Власов В. В., Медведев С. П. «Редакторы геномов». От «цинковых пальцев» до CRISPR // *Наука из первых рук*. 2014. Т. 56. №2. С. 44–53.

Косова А. А., Ходырева С. Н., Лаврик О. И. ДНК на замке // *Наука из первых рук*. 2013. Т. 53/54. №5/6. С. 14–21.

Медведев С. П. Как отредактировать наследственность // *Наука из первых рук*. 2014. Т. 55. №1. С. 10–13.

Сидоренко В. С., Гроллман А., Жарков Д. О. Токсикологический детектив, или Дело балканской эндемичной нефропатии // *Наука из первых рук*. 2013. Т. 53/54. №5/6. С. 22–33.

Ходырева С. Н., Лаврик О. И. Как клетка ремонтирует ДНК // *Наука из первых рук*. 2007. Т. 15. № 3. С. 82–89.

Goll M. G., Bestor T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. V. 74. P. 481–514.

Wu X., Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond // *Nat. Rev. Genet.* 2017. V. 18. N. 9. P. 517–534.



Клеточная ЭКЗОТИКА в России

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка, органоиды, нейродегенеративные заболевания.

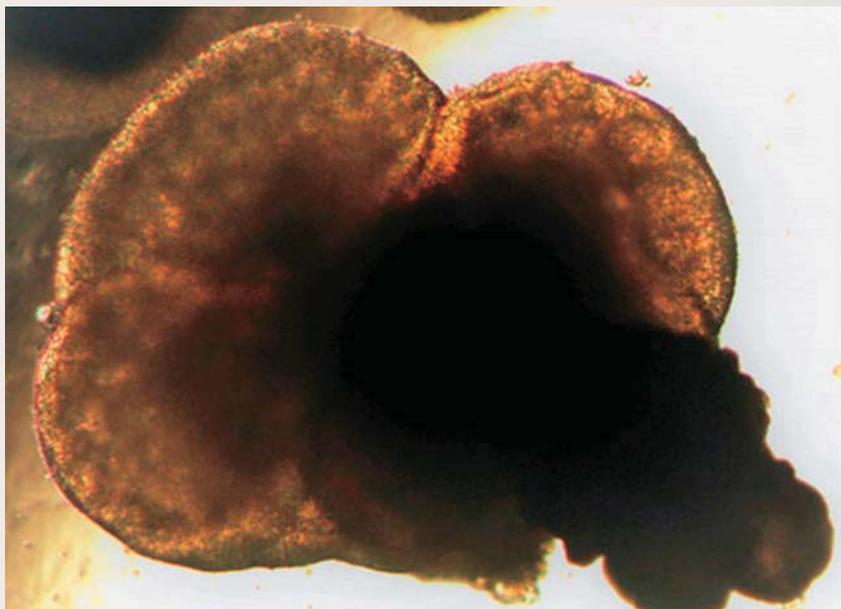
Key words: induced pluripotent stem cells, differentiation, organoids, neurodegenerative diseases



Когда в 2006 г. японским ученым удалось повернуть программу развития клеток вспять и вернуть зрелые клетки взрослого организма в «детство», это стало одним из наиболее важных достижений биологической науки последних десятилетий. Автор технологии генетического репрограммирования клеток С. Яманака получил в 2012 г. Нобелевскую премию, а в мире биологии началась новая эра. Технология производства ИПСК (индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) позволила на принципиально новом уровне создавать модели заболеваний, проводить скрининг лекарственных средств. Ближайшей перспективой является создание новых средств терапии: после коррекции методами геномного редактирования патологии в ИПСК «исправленные» клетки будут пересаживаться больному человеку. Каковы шансы на успех у этих работ? И какова роль российских ученых в реализации этого амбициозного проекта?

ЛАГАРЬКОВА Мария Андреевна – член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (Москва), заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства (Москва). Автор и соавтор 75 научных работ и 6 патентов

На фото справа – так называемый «органويد» мозга, полученный из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Фазовый контраст. Слева – нейральные клетки, дифференцированные из ИПСК и помеченные красителями (зеленым цветом – нейроны, красным – глиальные клетки). Флуоресцентная микроскопия. Фото автора



К сожалению, в России мало лабораторий, специализирующихся на работе со стволовыми клетками или ИПСК: два института в новосибирском Академгородке, да несколько лабораторий в Москве и Санкт-Петербурге. С годами число нужных специалистов растет, но оно недостаточно, чтобы конкурировать с международными группами. Если в физике Россия хоть как-то «держит марку», то работы наших клеточных биологов зарубежным коллегам не особо интересны и воспринимаются, скорее, как экзотика. Опыт России в международных проектах по клеточной биологии – это отдельные работы конкретных ученых. Кроме того, Россия умудряется игнорировать мировой опыт. Так, к российскому Федеральному закону «О биомедицинских клеточных продуктах» есть

© М. А. Лагарькова, 2017

Семь лет назад кандидатские диссертации были посвящены получению ИПСК, характеристике клеток. Три года назад эти темы перешли на уровень магистерских работ, а сегодня – на уровень работы бакалавра

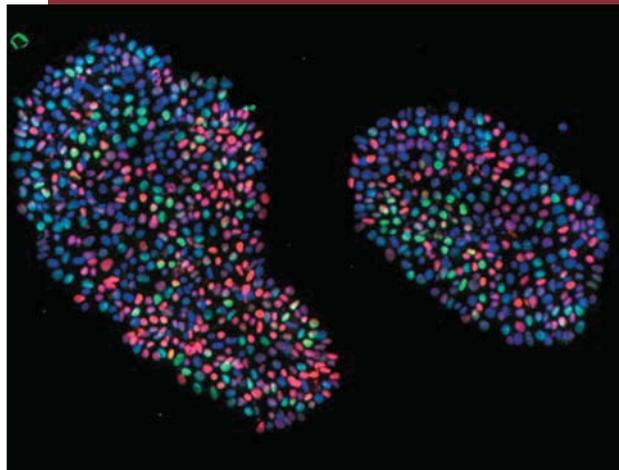
ВЕРНУТЬ КЛЕТКИ В «ДЕТСТВО»

Клетки, составляющие разнообразие тканей многоклеточного организма, претерпевают множество делений от момента оплодотворения яйцеклетки до смерти особи. В процессе развития организма клетки «дифференцируются» (становятся специализированными), теряя при этом потенциал к превращению в другие специализированные типы. В норме – это заложенный в генетической программе однонаправленный процесс: дифференцированная клетка не может опять стать стволовой.

Идея эпигенетической регуляции однонаправленного процесса развития была сформулирована еще в 1940-х гг. К. Уоддингтоном, который предложил и сам термин «эпигенетика» – изменение активности генов, не затрагивающее структуру ДНК. Успехи биологии последних десятилетий свидетельствуют в пользу возможности эффективно управлять состоянием клетки, изменяя ее функции и специализацию.

Впервые вернуть клетки в «детство», сделать их опять стволовыми, направляя в нужную сторону с помощью комплекса факторов, удалось в 2006 г. японским ученым К. Такахаши и С. Яманака, получившим плюрипотентные клетки из фибробластов мыши. Безусловно, эти работы базировались на предшествующих исследованиях Р. Бриггса, Т. Кинга, Дж. Гердона и других ученых, доказавших, что перенос ядра взрослой клетки в лишённую ядра яйцеклетку может привести к изменению генетической программы и началу роста нового организма.

Работая с сочетаниями 24 транскрипционных факторов, участвующих в приобретении и поддержании плюрипотентного состояния, Такахаши и Яманака определили комбинацию белковых факторов Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус (известную теперь как «коктейль Яманака»), экспрессия которых в соматической клетке приводит к ее превращению в плюрипотентную. Этот процесс получил название «генетического репрограммирования», а найденные клетки стали называть «индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками» (ИПСК). Технология репрограммирования оказалась универсальной и позволила получать плюрипотентные клетки из различных типов клеток не только мыши и человека, но и других животных, включая крыс, собак и свиней



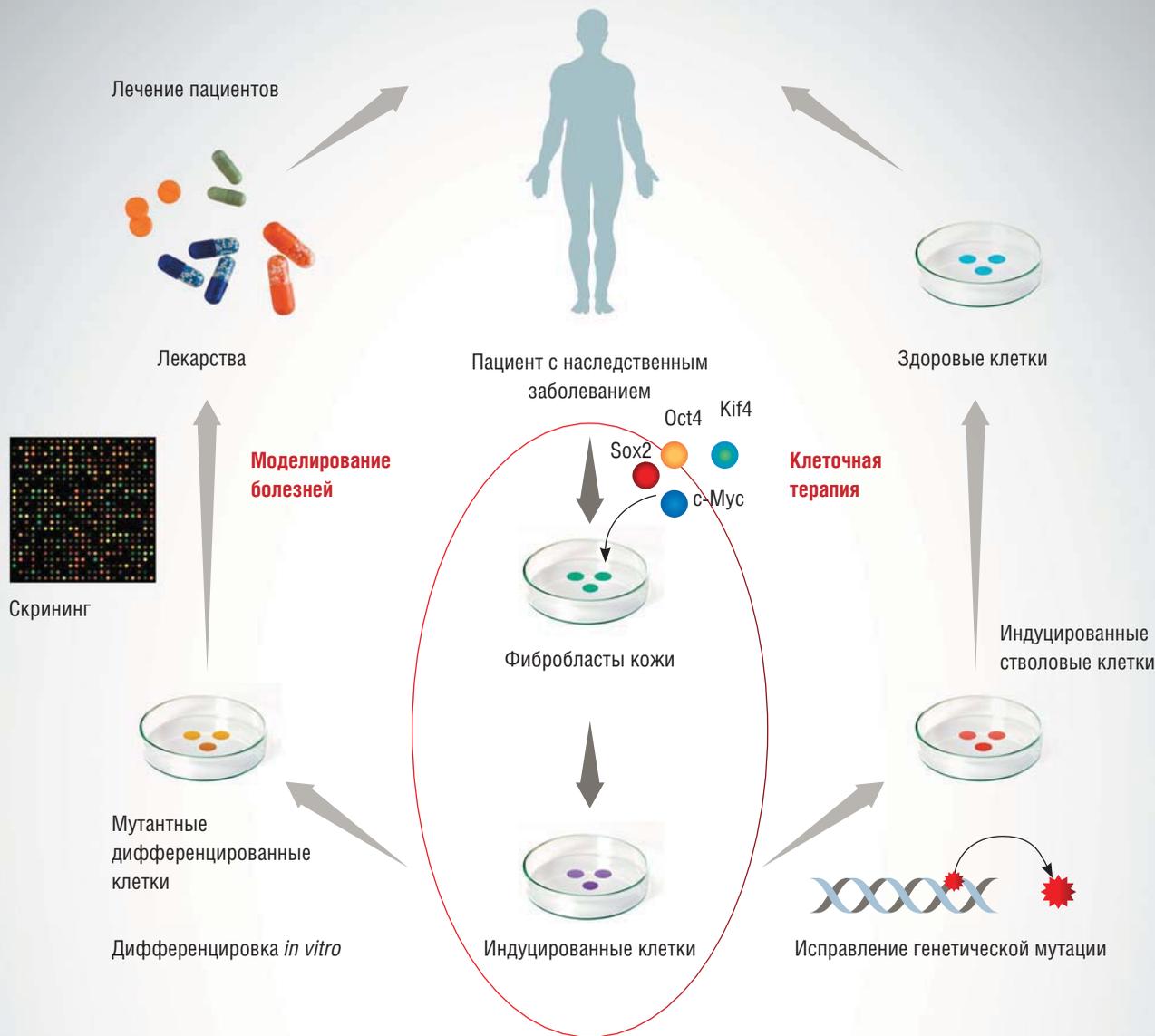
Колонии ИПСК, окрашенные антителами к транскрипционным факторам с-Мус и Nanog. Флуоресцентная микроскопия. Фото А. Богомазовой

много вопросов. Например, он не разрешает использовать фетальные и эмбриональные стволовые клетки в качестве источника для создания клеточных продуктов – подобных запретов нет ни в США, ни в Великобритании, ни в Японии.

США и Япония, лидеры в области клеточной биологии, обладающие финансовыми возможностями и способные привлечь интеллектуальную элиту со всего мира, уже начали клинические испытания первых ИПСК-клеточных продуктов. В Великобритании, Швеции, Голландии и многих других странах ведутся интенсивные работы в области плюрипотентных стволовых клеток. Конечно, вровень с Европой, США, Японией мы уже не встанем, однако некоторые исследования наших ученых вполне «на уровне». Главное – прилагать усилия, понимать, что творится в научном мире, достойно представлять себя в международных проектах и не заикливаться на том, что мировая наука ушла далеко вперед, а искать те ниши, где можно продуктивно работать: интересные феномены, неизвестные ранее механизмы. Наша лаборатория старается найти подобные ниши, и одна из них – это исследование молекулярных механизмов развития неврологических заболеваний, а именно – *атаксий*, нейродегенеративных заболеваний, которые поражают спинной мозг и мозжечок, в результате чего нарушается координация движений.

В поисках молекулярных механизмов атаксии

Основная проблема и с лечением, и с изучением нейродегенеративных заболеваний состоит в том, что, когда появляются первые симптомы, количество



живых, не пораженных болезнью клеток уменьшается настолько, что во многих случаях помочь человеку уже ничем нельзя, остается только поддерживающая паллиативная терапия. По этой же причине эти болезни нелегко изучать: косвенных исследований пациента (томография, анализы биологических жидкостей) недостаточно, а в образцах, взятых после смерти, нужные клетки уже погибли – изучать практически нечего. Поэтому, чтобы понять, что происходит при той или иной патологии на молекулярном уровне, нужны животные и клеточные модели.

В развитии атаксий генетически «виноваты» многократные повторы триплета CAG в гене, кодирующем аминокислоту глутамин, что вызывает избыточное встраивание глутаминовых остатков в некоторые белки.

В настоящее время известно 8 типов подобных расстройств. Спинаocerebellарная атаксия 1 типа – редкая болезнь, и ее в основном изучали на примере немногочисленных больных и частично – на животных моделях,

Практические приложения технологии ИПСК: скрининг химических веществ с целью поиска лекарств и исправление мутаций с последующей трансплантацией «вылеченных» клеток человеку. По: (Некрасов и др., 2014)

но в тонкие молекулярные механизмы не вникали. Мы создаем клеточные модели этого заболевания: берем у больного биопсию кожи, репрограммируем клетки до ИПСК и дифференцируем их в *нейроны Пуркинью* мозжечка, которые деградируют при этом заболевании.

Разработка технологически правильного протокола дифференцировки нейронов Пуркинью – первая наша задача, которую нам необходимо решить. Важно, чтобы протокол был воспроизводимым и «работал» для любой клеточной линии. Следующая задача – поиск молекулярных механизмов атаксии 1 типа с помощью ИПСК.

В рамках таких исследований необходимо сравнивать больные клетки со здоровыми. Проблема в том, что люди – это не мыши определенных линий,

и их индивидуальные различия могут сильно исказить картину. Поэтому нельзя сравнивать клетки больного и здорового человека – нужно использовать клетки, происходящие от одного и того же человека. Для этого нужно либо «вылечить» больные клетки, либо внести генетическими методами мутацию в геном здоровых клеток.

В случае атаксии 1 типа больше подходит второй вариант: мы научились с помощью метода CRISPR/Cas вносить в геном здоровой клетки повторы САG. Эта технология уже стала рутинной, и, сравнивая больные и здоровые клетки, мы исследуем «поведение» молекул РНК и белков, ищем механизмы развития заболевания. Работы идут вполне успешно.

ИПСК для окулистов и фармакологов

Другое направление работ нашей лаборатории связано с работами, результаты которых будут иметь практическое значение для медицины, хотя пока это не означает, что уже завтра мы будем кого-то лечить. Речь идет о получении из плюрипотентных клеток *пигментного эпителия* сетчатки глаза. Тут мы идем по проторенной дорожке: клинические испытания таких клеток уже начаты в Японии.

Пигментный эпителий – это очень важные клетки, именно их смерть во многом обуславливает дистрофию сетчатки. Они защищают от ультрафиолетового излучения, фагоцитируют (захватывают) слущивающиеся внешние мембранные диски фоторецепторов, выполняют барьерную функцию между сетчаткой и сосудистыми клетками, поддерживают водный обмен. Как уже было показано, пересадка клеток пигментного эпителия лабораторным животным (в том числе обезьянам) существенно улучшает у них течение смоделированного заболевания – дистрофии сетчатки глаза.

У нас отработана процедура получения пигментного эпителия сетчатки глаза из ИПСК, но, чтобы двигаться дальше, необходимо сотрудничество между молекулярными и клеточными биологами, физиологами, гистологами и оперирующими врачами. Такой союз – большая редкость.

Сейчас мы ведем переговоры с Институтом цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск), где есть интересная модель быстро стареющих крыс OXYs, у которых, в числе других симптомов, наблюдается ранняя *ретинопатия*, т.е. патология сетчатки. Возможно, эта модель подойдет для наших исследований. Мы надеемся, что сможем найти не только людей, которые будут оперировать крыс, но и редких, «вымирающих» в наше время специалистов – гистологов и физиологов, и запустим совместный проект, у которого есть хороший шанс дойти до клинических испытаний.

Органоид вместо органа

Клеточная и молекулярная биология сильно подвержены «модным тенденциям». Года три назад исключительно модным словом было «аутофагия», с этим понятием связывали многие клеточные процессы. Еще раньше таким словом был «апоптоз». Сейчас у нас модно работать методом редактирования генома CRISPR/Cas и говорить про *экзосомы* – маленькие мембранные пузырьки, с помощью которых клетки «общаются» друг с другом.

Одно из таких «модных» направлений, которым занимается и наша лаборатория, – это создание так называемых *органоедов*, продуктов самоорганизации группы плюрипотентных клеток. Если в начале дифференцировки суметь дать клеткам толчок в нужном направлении, между ними начинаются процессы взаимодействия, которые определяют условно, «где



Пигментный эпителий сетчатки глаза, полученный путем дифференциации плюрипотентных стволовых клеток человека, представляет собой гексагональные клетки, образующие плотные межклеточные контакты. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная линейка – 100 мкм. По: (Максимов, 2012)

голова, а где хвост», и начинают воспроизводить эмбриональную программу развития. Вырастает органоид, клеточная масса, которая по своим молекулярным и гистологическим характеристикам похожа на тот или иной орган.

Например, голландские ученые из одной стволовой клетки вырастили органоид кишечника, который содержал несколько типов клеток эпителия (эндокринные, секреторные, поддерживающие типы клеток), и с его помощью изучили, как взаимодействует с тканями кишечника бактерия *Helicobacter pylori*, которую считают причиной некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта (Dutta & Clevers, 2017). Этот процесс трудно посмотреть *in vivo* даже на модельном животном, но это просто сделать при работе с органоидами.

У нас в лаборатории уже растут органоиды глаз, а также мозга и мозжечка, с помощью которых мы планируем изучать атаксии.

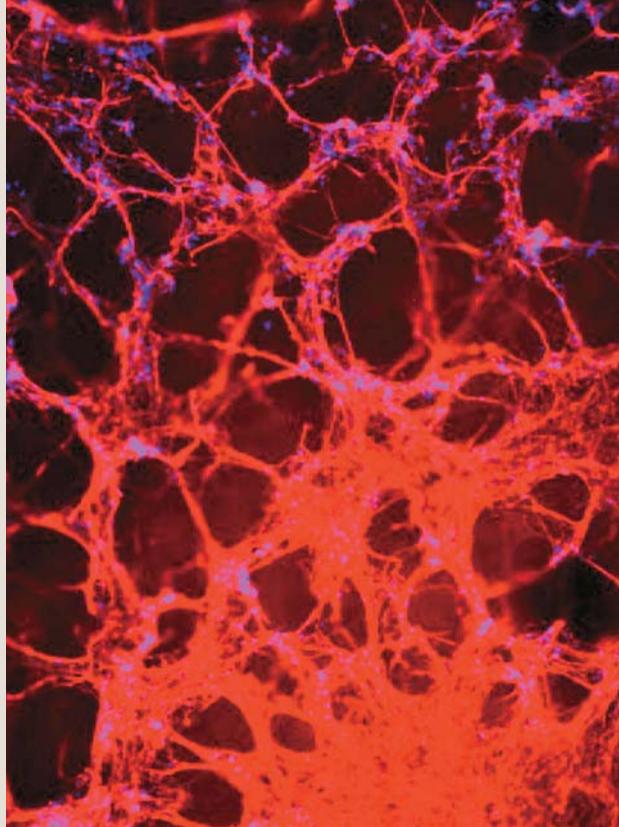
Редкие гомозиготы – шанс для ИПСК-терапии

Сейчас есть технологии и знания, которые позволяют при помощи ИПСК изучать патогенез заболеваний и проводить скрининг лекарств. Хотя пока неизвестно, когда мировая наука научится редактировать в индуцированных плюрипотентных клетках генетические патологии и пересаживать людям исправленные клетки.

Такой подход еще нигде не реализован, а если прорыв и случится, то, скорее всего, это будет дорого и долго. Ведь только от момента забора биопсии кожи до получения ИПСК проходит несколько месяцев. Каждая клеточная линия должна быть сделана в стандартных GMP-условиях (Good Manufacturing Practice, надлежащая производственная практика), пройти тесты на наличие мутаций и потенциальную способность образовывать опухоли.

Но существует и альтернативный подход, идея которого принадлежит С. Яманакэ: создание относительно универсальных линий ИПСК. Проблема в том, что у нас есть гены и белки, отвечающие за тканевую совместимость (гены *главного комплекса гистосовместимости*), и при их несовпадении при трансплантации развивается синдром отторжения тканей. Эти гены очень вариабельны, поэтому при необходимости пересадки органов (например, костного мозга) так трудно найти донора. Грубо говоря, каждый человек в мире может стать донором только для одного человека из каждых 40 тысяч. Вероятность совпадения генов комплекса гистосовместимости даже у родных брата и сестры – всего одна четверть.

У каждого из нас есть по две копии (*аллеля*) гена: одна досталась нам от отца, а другая – от матери. Но есть люди, у которых копии генов комплекса

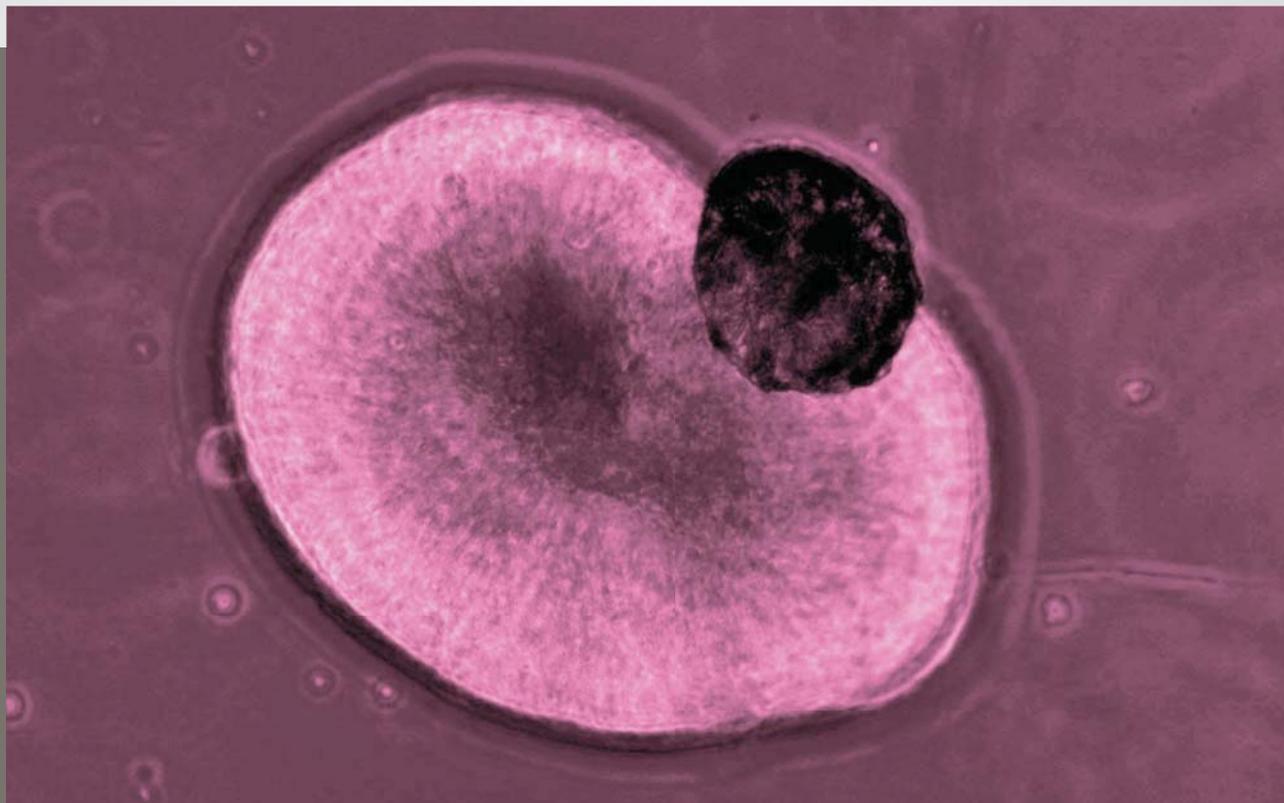


Нейроны, дифференцированные из ИПСК. Окраска антителами на бета-III тубулин. Флуоресцентная микроскопия. Фото автора

Для большинства нейродегенеративных заболеваний эффективные методы терапии пока еще не разработаны. Это связано с ограниченностью доступа исследователей к нервным клеткам человека и отсутствием адекватных модельных систем для изучения патогенеза заболеваний и тестирования лекарственных препаратов.

Поиск и разработка новых моделей для таких неизлечимых нейродегенеративных заболеваний человека, как болезнь Гентингтона, является весьма актуальной задачей. Недавно разработанная технология генетического репрограммирования позволяет из легкодоступных клеток (например, фибробластов кожи) получить в лабораторных условиях ИПСК, которые в свою очередь могут неограниченно расти в культуре и дифференцироваться в любые типы клеток, в том числе нейроны, столь необходимые для изучения молекулярных механизмов развития нейродегенеративной патологии.

На сегодняшний день созданный в лаборатории клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства (Москва) набор клеточных линий является уникальной платформой для изучения болезни Гентингтона. Он может быть использован для создания высокоэффективной системы, направленной на анализ молекулярных механизмов заболевания и поиск новых нейропротекторов методами высокопроизводительного скрининга



Органоиды – продукты самоорганизации клеток – способны к выполнению хотя бы части физиологической функции органа. Они состоят из нескольких типов клеток и должны в условиях лаборатории воспроизводить процессы, происходящие во время органогенеза в живом организме. Органоиды могут собираться не только из плюрипотентных клеток, но и из взрослых стволовых клеток, и даже из дифференцированных клеток.

На фото – органоид глаза, дифференцированный из ИПСК. Фазовый контраст. Фото автора

гистосовместимости одинаковые (т. е. они по этим аллелям *гомозиготны*), – это счастливое совпадение. Материал от таких доноров подойдет для пересадки (хоть органов, хоть ИПСК) любому человеку, у которого будет совпадение хотя бы одного аллеля. Подсчитано, что тридцати линий ИПСК от здоровых гомозиготных клеток достаточно, чтобы обеспечить совпадение при трансплантации 25–30% всего населения Японии, а пятидесяти – около 75%. Конечно, встречаются и совсем редкие генные аллели, но половина населения страны – это уже очень неплохо.

Яманака собирает банк таких гомозигот, и уже создано несколько клеточных линий на их основе. Японцам проще собирать такую базу, потому что у них существуют большие реестры потенциальных доноров

костного мозга с известными вариантами комплекса гистосовместимости.

В России практически нет пропаганды донорства костного мозга, и поэтому база доноров очень небольшая. Я считаю, что ее нужно развивать, ведь для этого надо всего лишь сдать кровь (перед этим внутривенно вводят препарат, благодаря которому в кровь попадают клетки костного мозга). Это обычная практика, например, в Германии. Думаю, и Россия к этому придет.

Прошло более десяти лет с открытия генетического репрограммирования соматической клетки до плюрипотентного состояния. В этом году в журнале *New England Journal of Medicine* опубликованы результаты первой трансплантации клеток, производных ИПСК, пациентке с дистрофией сетчатки глаза. Войдут ли в широкую клиническую практику клетки, производные ИПСК (нейроны, инсулин-продуцирующие клетки и т. д.), покажет время. По мнению автора этой статьи, – должны.

В России несколько научных групп используют ИПСК для создания моделей заболеваний, в том числе нейродегенеративных, создают изогенные системы методами геномного редактирования. Довольно много работ посвящено изменению структуры и эпигенетического состояния хроматина при репрограммировании и дифференцировке.

У российских биологов нет традиции создавать научные коллаборации. В США даже конкурирующие группы часто объединяются, закрыв глаза на разногласия и понимая, что такая совместная работа выведет исследования на новый уровень. Ради достижения цели ученые делятся клеточными культурами, лабораторными моделями заболеваний, оборудованием. Нашей лаборатории с сотрудничеством очень повезло. Мы много лет работаем вместе с Научным Центром Неврологии (чл.-корр. РАН С. Н. Иллариошкин и его коллеги), с Институтом Цитологии РАН (профессор Е. В. Казначеева и ее сотрудники), еще с несколькими институтами и университетами России. И, конечно, нельзя не упомянуть проф. С. Л. Киселева из института Общей Генетики РАН, благодаря которому начались и были сделаны первые в стране работы с плюрипотентными клетками человека

За прошедшие годы с помощью ИПСК было проведено множество интересных фундаментальных научных работ, посвященных механизмам поддержания плюрипотентности, тканеспецифической дифференцировки. Область эта исключительно конкурентная, но довольно дорогая. Тем не менее ИПСК оказались удобным инструментом для изучения молекулярных механизмов заболеваний, органогенеза и других процессов.

Литература

Богомазова А. Н., Васина Е. М., Киселев С. Л. и др. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования // Генетика. 2015. Т. 51. № 4. С. 466–478.

Иллариошкин С. Н. Болезнь Гентингтона как модель для изучения нейродегенеративных заболеваний // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. 2016. № 1. С. 3–11.

Максимов В. В., Лагарькова М. А., Киселев С. Л. Генная и клеточная терапия заболеваний сетчатки глаза // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7. № 3. С. 12–20.

Некрасов Е. Д., Лебедева О. С., Васина Е. М. и др. Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток // Экспериментальная неврология. 2012. Т. 6. № 4. С. 30–35.

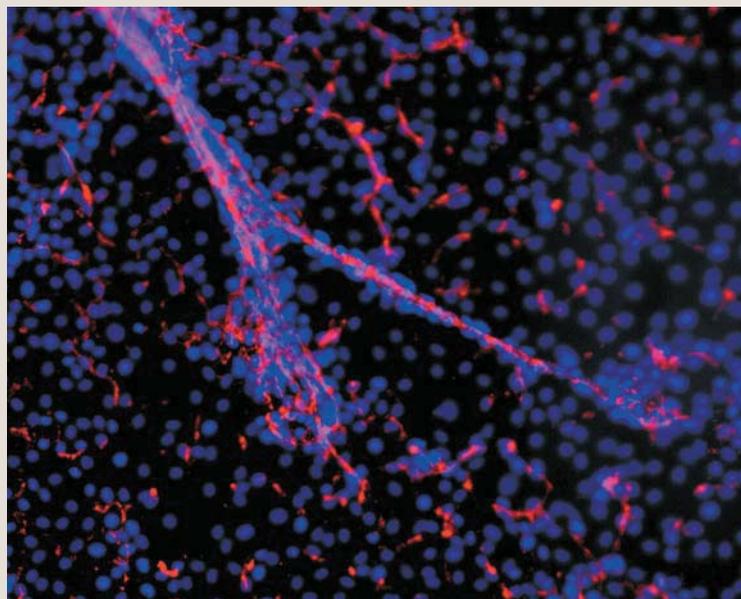
Шевченко И. С., Захарова А. Г. Органы из пробирки // НАУКА из первых рук. 2014. Т. 55. № 1. С. 19–23.

ОРГАНЫ ИЗ ПРОБИРКИ

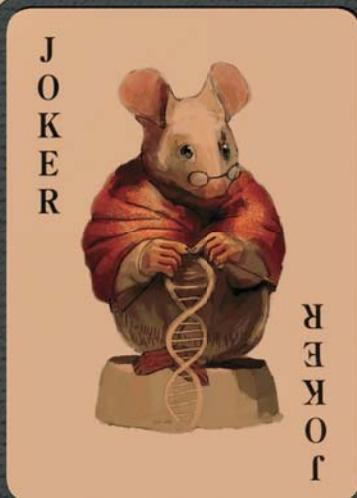
Группа новосибирских исследователей из Института цитологии и генетики и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина занимается разработкой тканеинженерных подходов для регенеративной медицины сосудов.

Актуальность этой темы связана с тем, что в наши дни быстро растет число больных с патологией кровеносных сосудов, причем лечение подобных заболеваний зачастую предусматривает замену сосудов на аутологичные (донорские) либо синтетические. Оба эти варианта имеют свои ограничения, альтернативой является использование тканеинженерных протезов сосудов.

В Новосибирске был разработан протокол получения специфических васкулярных клеток, которые способны формировать кровеносные сосуды из биопсийного материала, а также из плюрипотентных стволовых клеток человека, подвергнутых направленной дифференцировке. Полученные сосудистые клетки детально исследуются с помощью различных функциональных и молекулярно-генетических тестов, а затем ими заселяются синтетические поверхности. Полученный в результате сосудистый протез по своим свойствам близок к натуральному кровеносному сосуду (Шевченко, Захарова, 2014)



Сосудоподобные структуры, полученные в результате направленной кардиоваскулярной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Флуоресцентная микроскопия. По: (Шевченко, Захарова, 2014)



Что на роду написано, того не миновать?

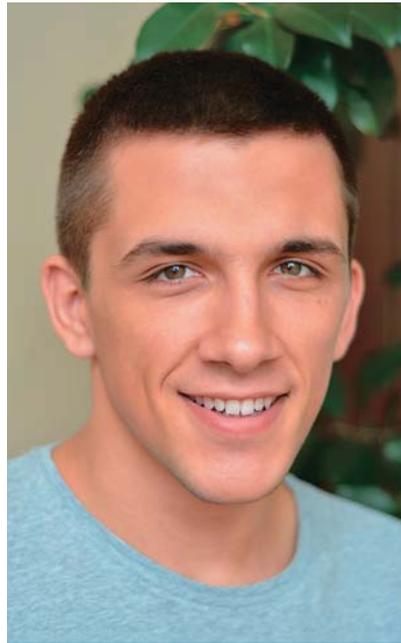
Редактирование генома в терапии наследственных заболеваний

Наследственность – это своего рода фатализм нашего времени. Расшифровка последовательности ДНК сродни предсказанию судьбы человека. Нам говорят, что гены определяют все: от цвета глаз до склонности к девиантному поведению. Добавьте к этому болезни, передающиеся по наследству, и мутации, связанные с риском развития таких болезней, как рак. Но можно ли пойти наперекор зловещему року и изменить судьбу, записанную на «скрижалях» ДНК? Да, это возможно, и если не сегодня, то в недалеком будущем. Генетическая инженерия занимается этими проблемами уже несколько десятков лет, однако в последние годы вокруг редактирования геномов возник особый ажиотаж. Что же изменилось? Ответ на этот вопрос – аббревиатура CRISPR/Cas

Все началось в 1987 г., когда в бактериальной ДНК были обнаружены странные нуклеотидные повторы, разделенные небольшими участками уникальных последовательностей. Спустя десять лет было показано, что эти повторенные последовательности, названные CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), являются системой адаптивного иммунитета бактерий – способом защиты против чужеродной ДНК, в частности, против бактериальных вирусов (*бактериофагов*).

Но какое отношение имеет это к наследственным болезням человека? Все дело в механизме действия системы CRISPR. Бактериофаги впрыскивают в клетку бактерии свою ДНК, которая многократно копируется и упаковывается в белковую оболочку за счет «хозяина» – таким образом на свет появляются новые бактериофаги. Защитная система бактерии, включающая белок-«ножницы» Cas, распознает чужую ДНК в случае, если она уже встречалась с ней раньше, и разрезает ее. Захватчики побеждены.

Узнавание мишени происходит по знаменитому принципу *комплементарности*, по которому образуются пары нуклеотидов в двуспиральной структуре ДНК. Этот принцип работает во всех живых организмах на нашей планете, включая клетки человека. Поэтому главное в механизме CRISPR/Cas – его простота и универсальность.



НЕМУДРЫЙ Артем Александрович – младший научный сотрудник лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики и лаборатории стволовой клетки Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 4 научных работ, в том числе 1 монографии

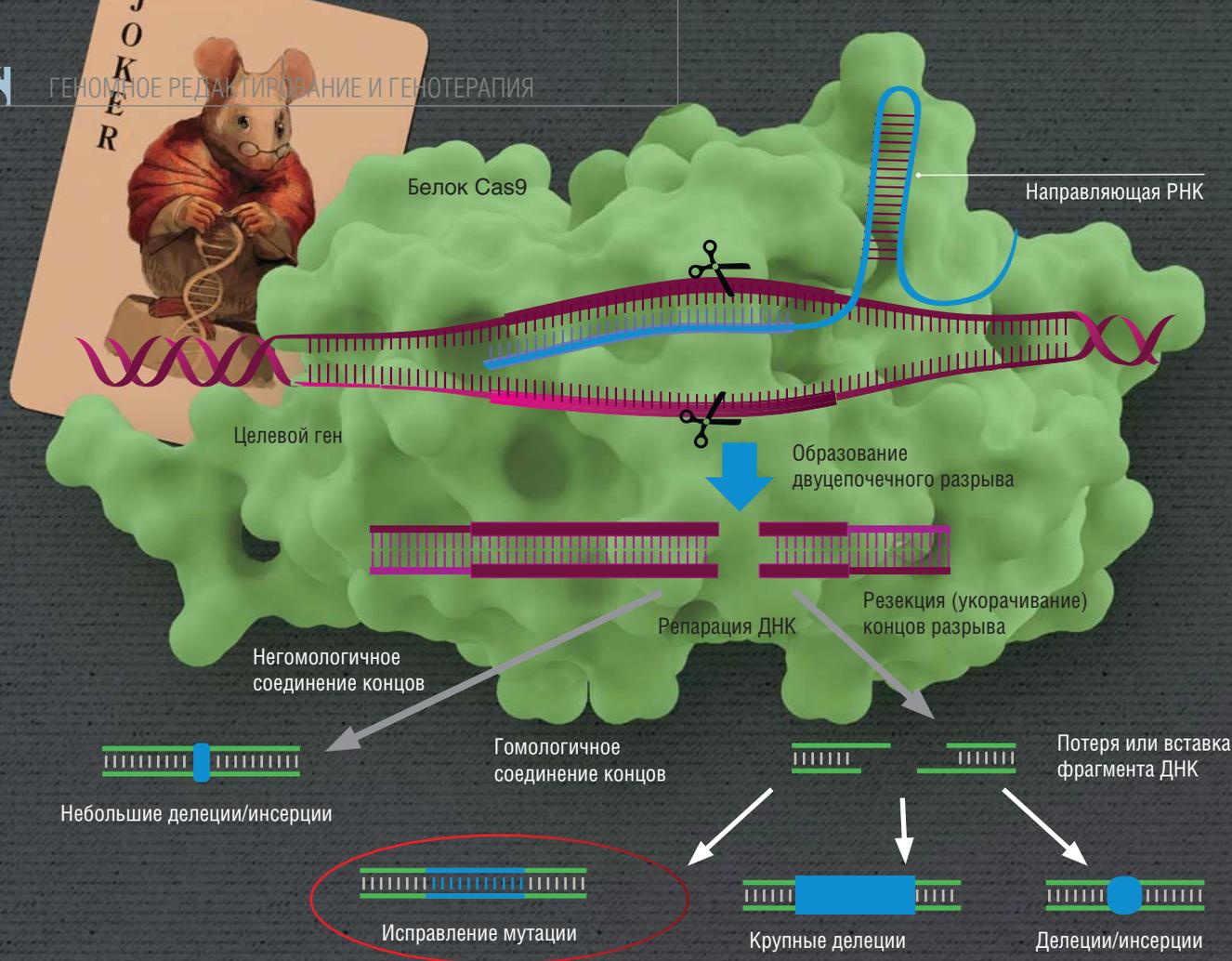
Ключевые слова: редактирование геномов, CRISPR/Cas9, исправление мутаций, терапия наследственных заболеваний.

Key words: genome editing, CRISPR/Cas9, genetic correction, hereditary disease therapy



ЗАКИЯН Сурен Минасович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики, лабораторией стволовой клетки Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск); лабораторией молекулярной и клеточной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск), лабораторией клеточной инженерии ФЕН Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор более 200 научных работ, в том числе 33 монографий и 5 патентов

© А. А. Немудрый, С. М. Закиян, 2017



Эффектором системы геномного редактирования CRISPR/Cas является комплекс РНК с белком Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes*. В этом комплексе направляющая РНК отвечает за распознавание гена-мишени, а белок вносит разрыв. Репарация ДНК в месте разрыва может происходить разными путями. При «прямом» сшивании путем негомологичного соединения концов в ДНК с большой частотой могут возникнуть мутации. Также можно исправить первоначальную мутацию путем гомологичной рекомбинации с сестринской хромосомой либо искусственной донорской молекулой ДНК. При этом возможно образование случайных мутаций, связанных с потерей или вставкой нуклеотидов. По: (Ceccaldi et al., 2016)

Знаковое событие случилось в 2012 г., когда была опубликована совместная работа французки Э. Шарпентье и американки Д. Дудна, где было показано, что бактериальная система CRISPR/Cas может быть использована для внесения разрывов в последовательность любой ДНК, что свидетельствовало об ее огромном потенциале для редактирования геномов (Jinek et al., 2012). Ведь, зная нуклеотидную последовательность, можно внести разрыв в точно выбранное место любой ДНК.

Так в руках ученых оказался простой и эффективный инструмент, позволяющий направленно вносить изменения в ДНК живой клетки, т. е. переписывать те самые «скрижали». С тех пор вышли сотни научных статей, свидетельствующих о том, что эта система работает в самых различных видах организмов, позволяет внести разрывы в любые последовательности генов, в том

числе несущие мутации, вызывающие наследственные болезни (Немудрый, 2014).

Ремонтируем ДНК направленно

Но вот ДНК разрезана – что дальше? Дальше идет «ремонт» (*репарация*). Вообще разрывы в ДНК не такая уж и редкость: ежедневно в каждой клетке человека под действием активных форм кислорода их возникает около 10 тысяч, и клетка их тщательно «штопает», восстанавливая целостность ДНК (Helbock et al., 1998). Но эти разрывы случайны, в отличие от действия CRISPR/Cas.

Направленные разрывы, внесенные CRISPR/Cas, могут быть репарированы по-разному: существует несколько способов, отличающихся механизмом, точностью и т. п. В зависимости от пути репарации можно

получить следующие результаты. Во-первых, «сломать» ген, если при репарации ДНК произойдет мутация. Такого эффекта можно добиться, если репарация произойдет, например, по механизму *соединения негомологичных концов*, для которого характерна неточность. Также возможно добиться крупной *делеции* (утраты фрагмента ДНК) и удалить участок либо целый ген.

Во-вторых, можно «переписать» определенную последовательность ДНК в клетке. Как известно, при репарации разрывов по пути *гомологичной рекомбинации* восстановление поврежденного участка ДНК идет по шаблону сестринской хромосомы (в клетках у нас присутствует по две копии каждой хромосомы – от отца и от матери). Фокус в том, что клетку можно обмануть, «подсунув» ей вместо сестринской хромосомы искусственно созданную «донорную» ДНК. Если такая ДНК будет «похожа» на поврежденный участок, то клетка может использовать ее в качестве образца.

Сестринская хромосома присутствует в клетке в единичном экземпляре, а копий «донорной» ДНК можно доставить множество, что дает искусственной ДНК конкурентное преимущество, пусть она и отличается немного от поврежденного участка. Таким образом можно «исправить», к примеру, мутацию, или вставить небольшой новый фрагмент ДНК.

И вот здесь мы вплотную подходим к терапии генетических заболеваний. Начнем с того, что все такие патологии отличаются друг от друга: они вызваны мутациями в разных генах, да и сами мутации могут иметь

различную природу и давать разный эффект в одном и том же гене. Соответственно, есть разные варианты применения геномного редактирования: ген можно «сломать» или просто удалить мутантный участок, «исправить» мутацию или, напротив, добавить в геном полезные «терапевтические» мутации или даже новый дополнительный трансген.

В теории все это выглядит прекрасно, но вот в чем вопрос: в организме взрослого человека имеются десятки триллионов клеток, и в каждой из них содержится мутантный ген. Как эти подходы применить на практике? Как лечить реального пациента?

Существуют «терапевтические» мутации, предотвращающие развитие заболеваний. Например, мутации в гене CCR5 предотвращают заражение клеток ВИЧ (Genovese et al., 2014, Liu et al., 1996), а мутация A673T в гене APP – развитие болезни Альцгеймера (Jonsson et al., 2012). С помощью системы CRISPR/Cas можно внести в геном необходимые изменения, «сломать» целевые гены либо внести целевые замены (Cox et al., 2015)

С помощью системы CRISPR/Cas можно добиться разных результатов. Можно просто «сломать» ген, кодирующий токсичный белок, внося в него «нерабочую» мутацию (1), либо, напротив, «починить» его, удалив мутантный участок (2), как было показано на «мышинной модели» мышечной дистрофии Дюшенна (Tabebordbar et al., 2016). Мутацию можно исправить, заменив участок гена искусственно синтезируемым фрагментом (3). Наконец, можно направленно встроить в безопасный участок генома дополнительный «здоровый» трансген, если собственный ген «сломан» или не работает (4).
По: (Cox et al., 2015)

1. Выключение мутантного гена



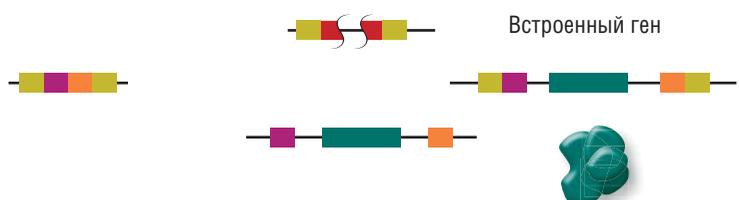
2. Удаление участков гена



3. Исправление мутации



4. Направленная встройка трансгена



Работаем «в пробирке» и в организме

На самом деле в большинстве случаев нет нужды исправлять мутацию в каждой клетке организма. Например, серповидноклеточная анемия вызвана мутациями в гене, кодирующем субъединицу гемоглобина, что приводит к дисфункции только клеток крови – эритроцитов. А наследственные нейродегенеративные заболевания, например боковой амиотрофический склероз, связаны с гибелью нейронов определенных типов. Таким образом, мишенями для терапии многих генетических заболеваний могут быть клетки лишь определенных органов или тканей, где специфично синтезируются/не синтезируются продукты мутантных генов.

Суть редактирования геномов *ex vivo* («вне живого») заключается во введении в организм «здоровых» клеток, в которых, к примеру, будет синтезироваться нужный белок. Но если вводить клетки, взятые даже от здорового донора, то организм пациента с большой вероятностью их отторгнет. Поэтому нужно взять клетки самого пациента и изменить в них мутантный ген, а потом ввести их обратно. Наиболее разработан этот подход для заболеваний крови, поскольку забор и пересадка костного мозга, где идет кроветворение, практикуется с 1959 г.

Но что делать в случае, если «дефектные» клетки не так просто получить? Например, если болезнь проявляется в головном мозге? Вдобавок не все типы клеток способны пережить все процедуры в чашке Петри вне организма. Здесь на помощь приходит другая крайне перспективная технология нашего времени, связанная с получением так называемых *индуцированных плюрипотентных стволовых клеток* (ИПСК).

Относительно простой и эффективный способ получения стволовых клеток из клеток кожи в результате репрограммирования был изобретен в 2006 г. японскими исследователями К. Такахаси и С. Яманака (Takahashi & Yamanaka, 2006). Таким образом, появился метод вернуть практически любую клетку организма (крови, кожи, жировой ткани и т. д.) в состояние стволовой.

Возможность использования ИПСК для клеточной терапии наследственных заболеваний была впервые продемонстрирована на модели серповидноклеточной анемии (Hanna *et al.*, 2007). В геном лабораторных мышей были встроены мутантные гены человека, приводящие к развитию этой болезни.

Из клеток кожи этих животных были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, в которых мутация была исправлена с помощью гомологичной рекомбинации. Путем направленной дифференцировки из этих клеток были получены стволовые предшественницы клеток крови, которые

Плюрипотентные стволовые клетки бессмертны: теоретически они могут делиться бесконечно и при действии определенных стимулов образовывать любые клетки тканей и органов взрослого организма. Используя необходимый набор стимулов, можно направить развитие стволовых клеток в определенный тип клеток, например, в нейроны. Этот процесс называют направленной дифференцировкой

трансплантировали в организм животных. Последние не только прижились, но и превратились в здоровые эритроциты. Лечение оказалось успешным.

С тех пор список наследственных болезней, для которых успешно был опробован этот подход, пополнился десятками наименований и продолжает расти.

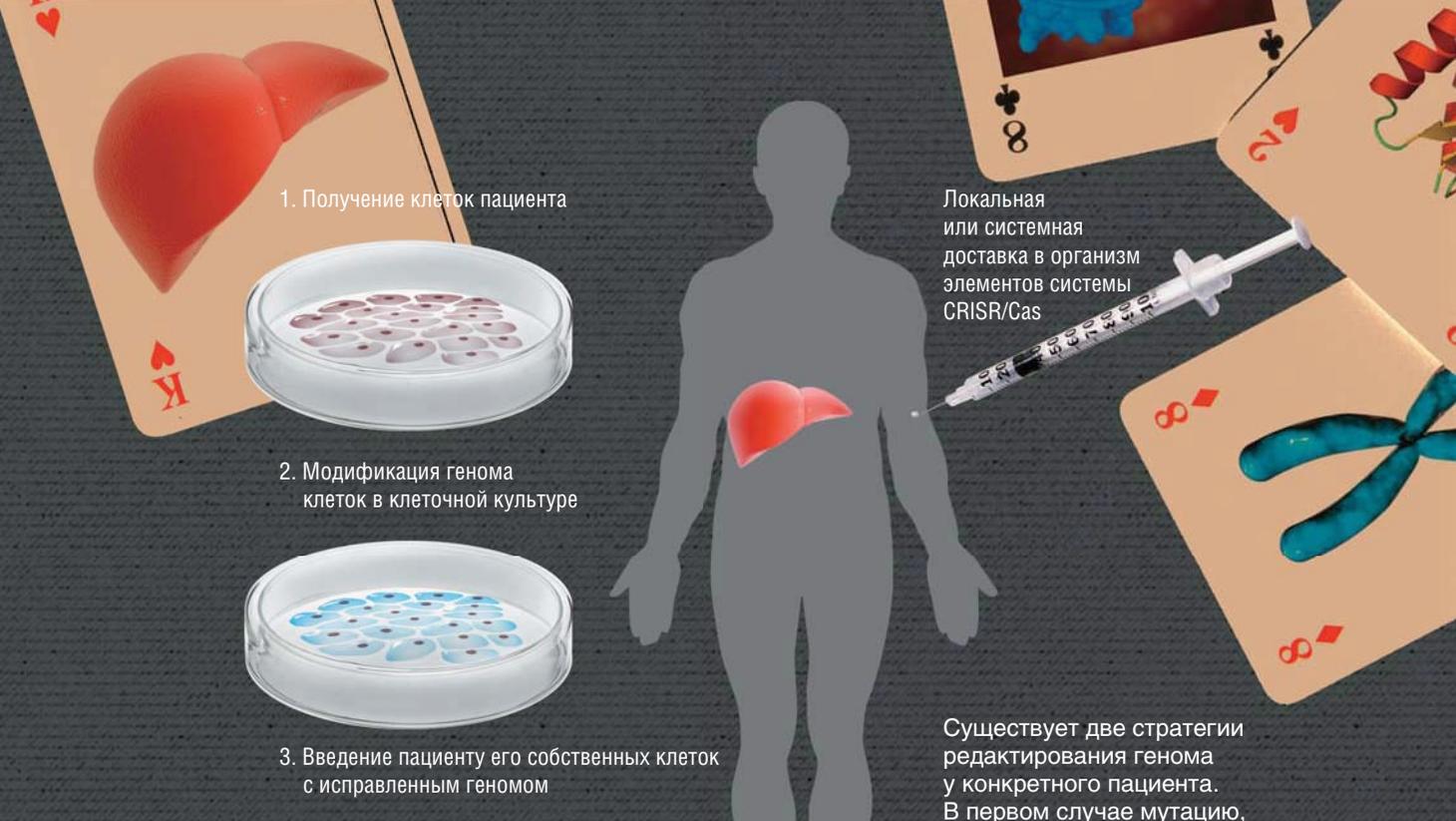
Но зачем тратить время и деньги на извлечение и культивирование клеток, если можно все сделать прямо «на месте»? Ведь система CRISPR/Cas в силу своей универсальности теоретически способна работать непосредственно в клетках живого организма. Главная проблема – это эффективно и безопасно доставить элементы этой системы в нужное место.

Сегодня наиболее часто для доставки генов CRISPR/Cas в организм используются вирусные частицы. В качестве таких носителей обычно выступают аденоассоциированные вирусы – дефектные вирусы, способные размножаться только в присутствии «помощников»-аденовирусов. Эти вирусы эффективно заражают клетки человека, но не вызывают у него никаких патологий. А вирусные частицы, в геном которых встроены гены CRISPR/Cas, после заражения уже не могут размножаться. При этом разные серотипы этих вирусов имеют «склонность» к разным тканям. Например, серотип AAV8 предпочитает ткани печени, а уже сегодня можно создать искусственные серотипы, нацеленные на любой орган.

Активно развиваются и невирусные способы доставки, например, упаковка готовых молекулярных комплексов РНК-белок в липосомы (липидные пузырьки) или полимерные частицы. Это более безопасно, а также обеспечивает более строгий контроль над дозой.

Это все здорово, но...

Всегда есть это «но». Технология CRISPR/Cas начала применяться для редактирования геномов млекопитающих пять лет назад. На сегодня получено колоссальное количество данных, достигнут огромный прогресс на пути к клиническому применению, но все же остается ряд вопросов, которые необходимо будет решить для каждого конкретного генетического заболевания. Например, какая доставка будет оптимальна? Приживутся ли введенные клетки? Какова будет эффективность и безопасность лечения? И *etc.* ...



Существует две стратегии редактирования генома у конкретного пациента. В первом случае мутацию, по сути, исправляют в чашке Петри – в культуре собственных клеток человека. Суперсовременная технология выглядит так: у пациента получают, к примеру, клетки крови и «возвращают» их в состояние стволовых. В таких индуцированных плюрипотентных стволовых клетках исправляют мутацию с помощью CRISPR/Cas, а затем путем направленной дифференцировки получают клетки нужной ткани или органа (например, гепатоциты – клетки печени), которые вводят пациенту. Другая принципиальная возможность – редактировать геном клеток непосредственно в организме пациента, вводя ему элементы CRISPR/Cas в кровь либо в конкретный орган.
По: (Cox et al., 2015)

числа клеток, его продуцирующих, может хватить, по крайней мере, для перевода болезни в более мягкую форму, а в некоторых случаях и для полного восстановления утраченных функций. Классическими же модельными заболеваниями в исследованиях по терапии с помощью геномного редактирования являются

Возьмем для примера пару вопросов из этого списка и посмотрим, какие конкретные ответы на них уже получены в научном сообществе. Одна из проблем использования CRISPR/Cas связана с возможностью нецелевых эффектов: система может вносить разрывы в участки, отличающиеся от целевого на несколько «букв» – нуклеотидов, что чревато риском возникновения нежданных мутаций. Особенно остро вопрос безопасности стоит при редактировании геномов *in vivo*, когда проверить результат предварительно невозможно.

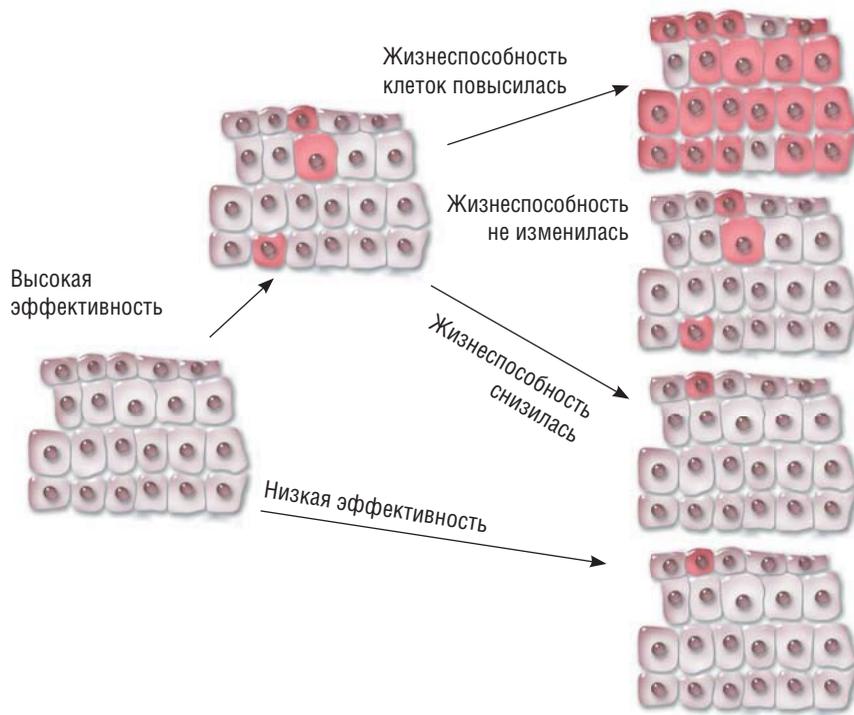
Для решения этой проблемы лидирующие группы ученых под руководством Д. Дудны, Ф. Чжана и К. Джунга независимо друг от друга создали мутантные «улучшенные» варианты белка Cas9 с повышенной специфичностью, частота нецелевых эффектов которых упала на несколько порядков.

Что касается эффективности терапии, то все зависит от особенностей самого заболевания и мутации, его вызывающей. Возможны три варианта: после исправления мутации жизнеспособность клеток увеличится, не изменится или ухудшится. В первом случае исправленные клетки получают конкурентное преимущество и могут постепенно заместить мутантные. Например, на линии мышей с наследственным заболеванием печени – *тирозинемией I типа* – было показано, что при системной доставке CRISPR/Cas непосредственно в организм животного мутация «исправляется» в 6% клеток печени. Даже такого небольшого количества клеток достаточно, чтобы предотвратить падение веса и привести в норму биохимические показатели печени животных. А более жизнеспособные клетки с исправленной мутацией начинают «обживать» печень.

Но, к примеру, в случае *гемофилии В* жизнеспособность клеток после исправления мутации не повышается. Тем не менее уже 3–7% клеток печени, продуцирующих нормальный фактор свертывания крови, достаточно для устойчивого терапевтического эффекта (Ohmori et al., 2017).

Что же касается исправления мутаций в онкогенах, то жизнеспособность и скорость пролиферации таких клеток будет снижаться относительно раковых, поэтому эффективность подобной терапии вызывает сомнения.

Тем не менее пример гемофилии В показывает, что если заболевание связано с отсутствием какого-то фермента или гормона, то небольшого



Эффективность терапии с помощью редактирования генома зависит от того, насколько жизнеспособными будут измененные клетки. Если исправление мутации повышает жизнеспособность клеток, они могут замещать другие клетки мутантного генотипа.
По: (Cox et al., 2015)

Возможности, которые дает нам технология CRISPR/Cas, пугающие и захватывающие одновременно. Сначала китайские исследователи, а затем их коллеги из США смогли внести изменения в эмбрионы человека. Недавно группа американских ученых под руководством Ш. Миталипова «исправила» в человеческом эмбрионе мутацию, вызывающую гипертрофическую кардиомиопатию (Ma et al., 2017). Эти эмбрионы были получены специально в результате искусственного оплодотворения, для которого были использованы здоровая яйцеклетка и сперматозоиды носителя мутации. Согласно современным нормам, зародыши были выведены из эксперимента на стадии бластоцисты. Однако с помощью современных репродуктивных технологий уже сегодня можно было бы имплантировать такие эмбрионы суррогатным матерям.

И здесь возникает очень серьезный этический вопрос: имеем ли мы право вмешиваться в ДНК человека? Или, наоборот, этично ли бездействовать, обрекая будущего ребенка на страдания?

Генетические изменения, внесенные в эмбрионы, сохраняются во всех клетках взрослого организма, и, соответственно, будут передаваться по наследству. Какой эффект окажет распространение таких модифицированных генов на человеческую популяцию в эволюционном аспекте, не говоря уже о риске возникновения новых евгенических движений?

Именно поэтому Д. Дудна, имеющая колоссальный авторитет в научном мире, призывает своих коллег

гемоглобинопатии и мышечная дистрофия Дюшенна. Именно на этих заболеваниях была подтверждена работоспособность концепций такого лечения, показано, что клетки с исправленной мутацией демонстрируют «здоровый» фенотип. В случае мышечной дистрофии Дюшенна такие клетки не только успешно встраивались в мышечную ткань взрослых мышей, но и улучшали функциональные показатели всей мышцы в целом.

Система CRISPR/Cas9 открывает перед человечеством большие перспективы, но нужно понимать, что это не волшебная палочка для решения всех проблем, а инструмент, такой, как, например, молоток. И нужно учиться применять этот инструмент для каждой конкретной задачи.

Главный шаг, который уже был сделан в этой области, – это выход за пределы лабораторий. Уже существует ряд компаний, занимающихся внедрением технологии CRISPR/Cas в практику, и не только медицинскую. Этот подход, к примеру, используется сегодня для получения модифицированных микробов для нужд биотехнологии и модифицированных растений.

Можно ожидать, что уже в ближайшее десятилетие новая технология найдет и клиническое применение. Так, в 2016 г. в Китае стартовали первые клинические испытания нового метода иммунотерапии метастазирующего немелкоклеточного рака легкого, в котором используются Т-лимфоциты с «отредактированным» геномом.

С помощью технологии геномного редактирования можно не только лечить наследственные заболевания, но и создавать «дизайнерских» детей. Ведь если можно исправить ген, вызывающий болезнь, то почему бы не изменить ген, регулирующий цвет глаз, продолжительность жизни, наконец, интеллект? Уже сегодня в Китае с помощью CRISPR/Cas выведены собаки породы бигль, у которых «выключен» ген, кодирующий миостатин – фактор, подавляющий рост мышечной ткани. В результате эти животные отличаются повышенной мускулистостью. А что мешает «выключить» этот ген в эмбрионе человека?

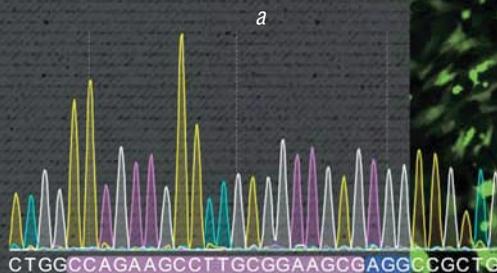


С. М. ЗАКИЯН: «НАМ БЫЛ БРОШЕН ВЫЗОВ, И МЫ ДОЛЖНЫ НА НЕГО ОТВЕТИТЬ!»

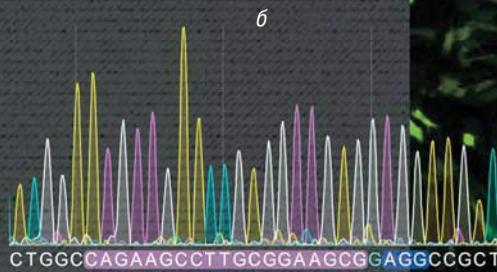
Исследования по применению системы CRISPR/Cas для терапии наследственных заболеваний начались в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН под руководством С. М. Закияна в 2013 г., буквально сразу после выхода первых публикаций на эту тему.

Исследования ведутся на лабораторных крысах линии Brattleboro – модели генетически детерминированного заболевания, при котором наблюдается дефицит гормона аргинин-вазопрессина. В результате у животных развивается наследственный несахарный диабет с характерным для него чрезмерным потреблением жидкости. На сегодня уже получена линия клеток с исправленной мутацией в гене, кодирующем этот гормон.

В данном случае задача усложнялась тем, что ген вазопрессина по последовательности нуклеотидов схож с геном другого гормона – окситоцина. Более того, на участке, в котором возникла мутация у крыс Brattleboro, эти гены практически идентичны. Тем не менее удалось добиться специфичного действия CRISPR/Cas в гене вазопрессина без нецелевых двунитевых разрывов ДНК в гене окситоцина. На следующем этапе предполагается вводить исправленные клетки в организм животных для оценки терапевтического эффекта



Сайт узнавания CRISPR/Cas



У лабораторных крыс линии Brattleboro имеется рецессивная точечная мутация в участке гена AVP, кодирующего гормон вазопрессин – выпадение (делеция) гуанина. В экспериментах по геномному редактированию в ИЦиГ СО РАН из фибробластов кожи этих животных были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В конечном счете удалось получить линии стволовых клеток с исправленной мутацией, которые можно использовать в терапевтических целях. Вверху – секвеннограммы нуклеотидной последовательности фрагмента гена AVP мутантных клеток (а) и клеток с исправленной мутацией (б)

не торопиться с применением этой технологии на эмбрионах человека, пока не будут разработаны международные этические и законодательные нормы для ее регулирования. В наши дни по всему миру проходят встречи, конференции, конгрессы и симпозиумы, на которых обсуждается будущее CRISPR/Cas. Возможно, от решений, которые будут приняты на них сейчас, зависят судьба человечества и то, как будет выглядеть наш мир в будущем.

В сентябре 2018 г. в новосибирском Академгородке также планируется провести международный конгресс по современным технологиям редактирования геномов, на котором будет обсуждаться технология CRISPR/Cas и, в частности, ее будущее в Российской Федерации.

Литература

Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. П. и др. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6. № 3(22). С. 20–42.

Cox D. B., Platt R. J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges // *Nat Med*. 2015. V. 21. N. 2. P. 121–131.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity // *Science*. 2012. V. 337. N. 6096. P. 816–821.

Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S. W. et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos // *Nature*. 2017. V. 548. N. 7668. P. 413–419.

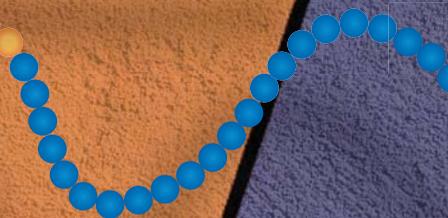


«Здоровый» ген *HTT*,
кодирующий белок
хантингтин

CAGCAGCAG...

Повторы триплетов нуклеотидов CAG

CAGCAGCAGCAGCAGCAG...



Мутантный ген *HTT*



CRISPR/Cas ПРОТИВ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА

Ключевые слова: редактирование генома, болезнь Гентингтона, моделирование заболеваний, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, изогенные линии клеток.

Key words: genome editing, Huntington's disease, disease modeling, induced pluripotent stem cells, isogenic cell lines

© Т.Б. Маланханова, С.М. Закиян, 2017

Сегодня, по данным Гарвардского центра нейроисследований, только в США около 5 млн человек страдают от болезни Альцгеймера; 1 млн – от болезни Паркинсона; 400 тыс. – от рассеянного склероза; по 30 тыс. – от бокового амиотрофического склероза (болезнь Лу Герига) и болезни Гентингтона. Эти расстройства, относящиеся к группе нейродегенеративных заболеваний, плохо изучены, и для них отсутствуют эффективные способы лечения. Решить эту проблему может помочь инструмент редактирования генов – система CRISPR/Cas9, которая на сегодняшний день активно и успешно применяется в биологии и медицине

За последние десятилетия средняя продолжительность жизни человека увеличилась, и теперь большее число людей доживает до того возраста, когда могут начать проявляться различные болезни, связанные со старостью. К таким «болезням старости» относятся и нейродегенеративные заболевания, большинство которых характеризуется постепенной и избирательной гибелью специфических типов нервных клеток. Причинами этих болезней чаще всего являются нарушения в геноме.

Рассмотрим эту проблему на примере болезни Гентингтона (другие названия – синдром Гентингтона, хорея Гентингтона или Хантингтона), проявляющейся такими симптомами, как нарастающая потеря двигательного контроля и психические расстройства. Несмотря на то, что генетическая мутация, вызывающая это заболевание, была выявлена более 20 лет назад, молекулярные механизмы его развития все еще до конца не выяснены, так же как не найдено эффективной терапии этой болезни.



МАЛАНХАНОВА Туяна Баировна – аспирант Новосибирского государственного университета, старший лаборант лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 3 научных работ и 1 монографии

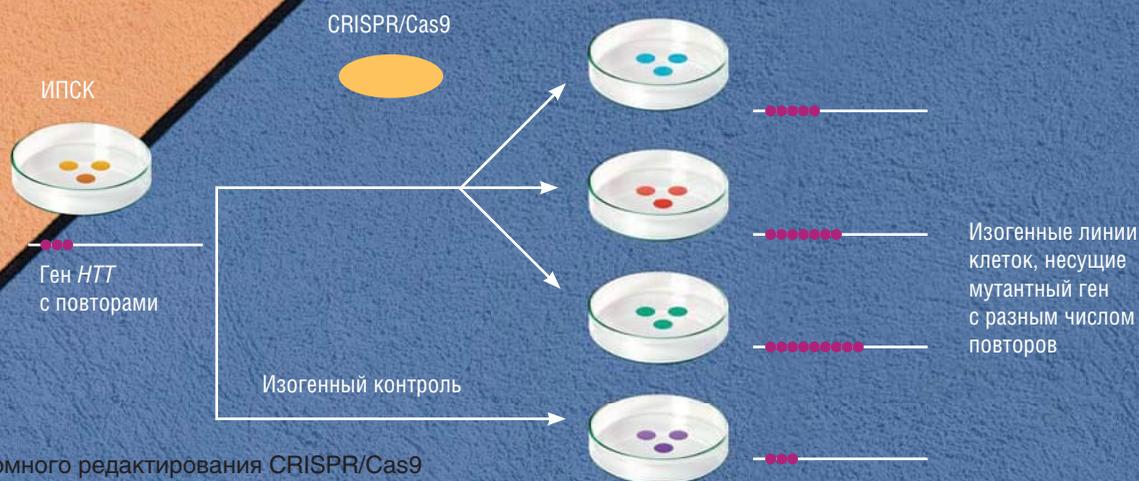
Моделируем болезнь

Причина болезни Гентингтона – увеличение числа тринуклеотидных повторов CAG в гене *HTT*, кодирующем белок *гентингтин*. В норме в этом гене содержится от 8 до 36 повторов, но, когда это число достигает 37 и более, начинается развитие заболевания. Триплет CAG кодирует аминокислоту *глутамин*. Соответственно, при болезни Гентингтона синтезируется гентингтин с удлинённой полиглутаминовой цепочкой. Такой белок имеет неправильную пространственную структуру и не может выполнять свою функцию в клетках, которая, кстати сказать, до сих пор точно неизвестна. Кроме того, в *стриатуме*, одном из отделов мозга,



ЗАКИЯН Сурен Минасович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики, лабораторией стволовой клетки Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск); лабораторией молекулярной и клеточной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск), лабораторией клеточной инженерии ФЕН Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор более 200 научных работ, в том числе 33 монографий, и 5 патентов

У людей с болезнью Гентингтона наблюдаются неправильные и неконтролируемые движения практически всех мышц тела («пляска святого Витта»), а также психические и когнитивные нарушения. Это тяжелое заболевание обычно начинает проявляться после 35 лет и имеет прогрессирующий характер



Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 сегодня используется для создания клеточных линий, моделирующих болезнь Гентингтона, через получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток человека

регулирующих мышечный тонус, мутантный белок формирует агрегаты, обладающие токсическим эффектом. При этом тяжесть протекания болезни напрямую зависит от числа повторов CAG.

Чтобы исследовать молекулярные процессы, приводящие к развитию патологии, а также для тестирования новых лекарственных препаратов нужна биологическая модель, максимально близко воспроизводящая болезнь человека. Для создания модели болезни Гентингтона ученые внесли в геном лабораторных мышей мутантный ген *HTT* человека. Однако результаты, полученные в подобных «мышинных» моделях, не всегда точно отражают процессы, протекающие в организме человека. Выход – клеточные линии, полученные от человека.

Для изучения болезни Гентингтона необходимо иметь клетки стриатума, но получить такой биоматериал затруднительно. Эта проблема решается с помощью *индуцированных плюрипотентных стволовых клеток* (ИПСК), которые достаточно легко с помощью перепрограммирования можно получить из клеток кожи или крови человека. Далее эти клетки можно наращивать в неограниченных количествах и *дифференцировать* (превращать) в практически любой нужный тип клеток.

Обычно при моделировании болезней используют клетки от больных людей, а в качестве контроля – от здорового донора. Однако из-за наличия в геноме людей огромного числа однонуклеотидных *полиморфизмов* такие пары клеток не совсем корректно сравнивать. Идеальным контролем для «больных» клеток будут клетки с точно таким же геномом, но уже без мутации, вызывающей заболевание. Такие клетки называют *изогенными парами* или *линиями*. Для создания изогенных линий и используют инструмент для редактирования генов CRISPR/Cas9.

Исследуем генное окружение

Несмотря на то, что болезнь Гентингтона является *моногенным заболеванием*, т.е. обусловлена мутацией в одном гене, известно более 100 так называемых генов-модификаторов, которые могут повлиять на время возникновения первых симптомов, тяжесть заболевания и т.д. Наиболее удобным инструментом для выяснения роли этих генов в патогенезе болезни Гентингтона является система *GeCKO* на основе CRISPR/Cas9 (Shalem *et al.*, 2014). Она позволяет создавать целые библиотеки генов-мишеней для CRISPR/Cas9 и выключать тысячи генов всего лишь за пару этапов. Таким образом, можно за короткий срок произвести *нокаут* (выключение) всех генов-модификаторов и выяснить, как это влияет на жизнеспособность клеток, скорость их деления и т.д.

С помощью инструментов на основе CRISPR/Cas9 сейчас можно редактировать не только геном, т.е. наследственную информацию, но и *эпигеном*, который отражает изменения в работе генов, не затрагивающие структуру ДНК. Благодаря геномному редактированию у нас появилась возможность менять уровень экспрессии целевых генов. Для этого уже разработаны инструменты, в которых используется «выключенный» Cas9, к нему присоединены различные ферменты, способные активировать или, напротив, подавлять уровень работы того или иного белка. Например, в случае болезни Гентингтона можно специфически подавлять синтез мутантного белка, тем самым препятствуя образованию белковых агрегатов и гибели нейронов стриатума.

Однако можно активировать и соединения, которые будут способствовать ускоренному удалению или деградации белков с неправильной структурой. Например, такой эффект достигается за счет активации белков теплового шока (*шаперонов*), которые прикрепляют

Участок гена *HTT* с повторами

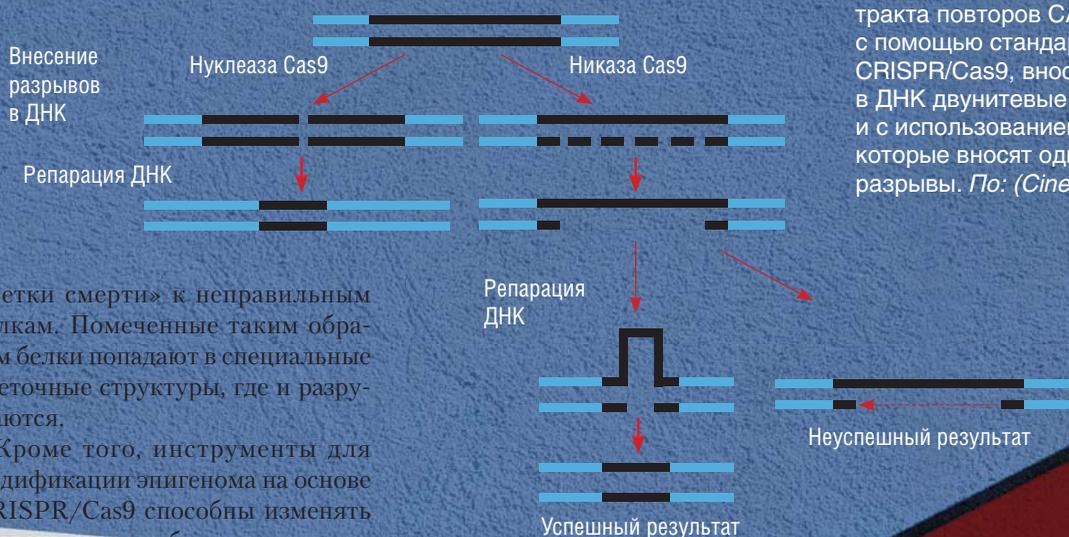


Схема укорочения удлиненного тракта повторов CAG гена *HTT* с помощью стандартной системы CRISPR/Cas9, вносящей в ДНК двунитевые разрывы, и с использованием никаза Cas9, которые вносят одностранные разрывы. По: (Cinesi et al., 2016)

«метки смерти» к неправильным белкам. Помеченные таким образом белки попадают в специальные клеточные структуры, где и разрушаются.

Кроме того, инструменты для модификации эпигенома на основе CRISPR/Cas9 способны изменять уровень синтеза белка за счет модификации *хроматина* – компактного комплекса ДНК, РНК и белков в хромосомах. Можно вносить такие модификации в хроматин, которые приведут к более «рыхлой» укладке ДНК, что активирует *транскрипцию* (считывание генетической информации на РНК). Другие же модификации могут, наоборот, способствовать более компактной укладке ДНК и замедлять или даже полностью блокировать транскрипцию.

Лечим?

CRISPR/Cas9 можно использовать и для лечения болезни Гентингтона. Есть два варианта воздействия: укорочение повторов CAG или специфическое выключение мутантной копии гена.

В первом случае с помощью CRISPR/Cas9 вносятся двунитевые разрывы в последовательность с повторами. Однако такое вмешательство имеет и обратный результат – увеличение числа повторов CAG. Проблема была решена путем использования *никаза Cas9* – мутантных белков Cas9, которые вносят в ДНК одностранные разрывы. Эксперимент показал, что последовательные одностранные разрывы в регионах с повторами в худшем

случае не изменяют длину участка с повторами, а в лучшем – приводят к его ожидаемому укорочению (Cinesi et al., 2016).

Использовать стратегию выключения гена можно в тех редких случаях, когда между двумя копиями гена *HTT* имеются однонуклеотидные различия. Если такие полиморфизмы будут находиться по обе стороны от участка с неправильными повторами, их можно будет использовать как мишени для «ножниц» CRISPR/Cas9. При этом нормальная копия гена не будет затронута (Shin et al., 2016).

Исследования болезни Гентингтона с применением системы CRISPR/Cas9 сегодня проводятся и в России. Так, в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) ведутся работы по получению изогенных линий стволовых клеток, моделирующих болезнь Гентингтона, путем внесения удлиненных трактов CAG в нормальный ген *HTT*, а также по дифференцировке ИПСК в нейроны стриатума. В дальнейшем новосибирские исследователи планируют перейти к изучению роли генов-модификаторов в патогенезе этой болезни с использованием клеточной модели.

Есть основания надеяться, что результаты исследований приведут к созданию эффективного метода лечения. Кроме того, они, возможно, помогут при изучении других нейродегенеративных заболеваний, развитие которых обусловлено подобной мутацией.

Литература

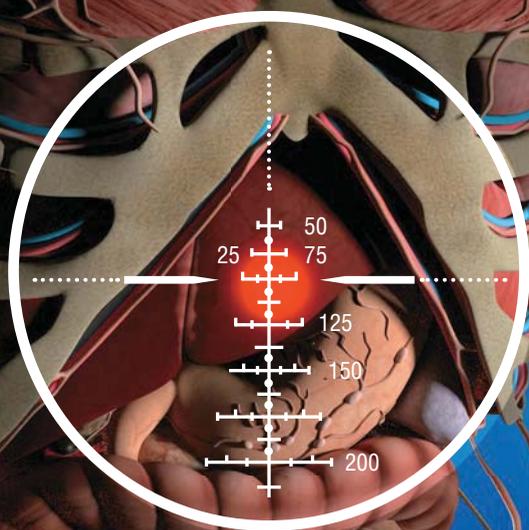
Медведев С. П. Как отредактировать наследственность // *НАУКА из первых рук*. 2014. Т. 55. № 1. С. 10–14.

Cinesi C., Aeschbach L., Yang B., Dion V. Contracting CAG/CTG repeats using the CRISPR-Cas9 nickase // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13272–13281.

Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E. et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells // *Science*. 2014. V. 343. N. 6166. P. 84–87.

Shin J.W., Kim K.-H., Chao M.J., et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9 // *Hum. Mol. Genet.* 2016. V. 25. N. 20. P. 4566–4576.

«Точная» ОНКОЛОГИЯ



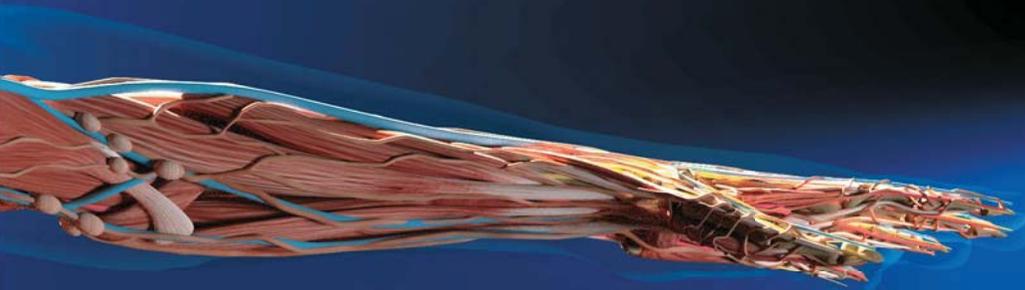
ПРОТИВ «СЛАБЫХ МЕСТ» ОПУХОЛИ

Человечество значительно продвинулось в лечении онкологических заболеваний, разработаны и применяются так называемые «таргетные препараты», прицельно повреждающие только клетки, несущие определенные генетические маркеры. Чтобы правильно применять подобные лекарства, нужно проводить молекулярную диагностику генетических изменений в опухоли. В такой диагностике особенно нуждаются не больные с первичной опухолью, а пациенты с метастазами и рецидивами: опухоль со временем «эволюционирует», приобретает устойчивость или чувствительность к тому или иному виду терапии. В России биомедицинским холдингом «Атлас» недавно был создан тест Solo для оценки молекулярного профиля опухоли в рамках «точной онкологии», позволяющий оценить потенциальную эффективность более 50 противораковых препаратов

Ключевые слова: рак, «точная» онкология, молекулярный профиль опухоли, таргетная терапия, внеклеточная ДНК, жидкостная биопсия

Key words: cancer, precision oncology, molecular profiling, targeted therapy, cell-free DNA, liquid biopsy

© А. В. Баранова, 2017



За последние десятилетия медицина значительно продвинулась в лечении онкологических заболеваний. Еще не так давно они были смертельны, но теперь, особенно при своевременной постановке диагноза и проведении терапии, многие пациенты не просто выживают, но живут долгой и полноценной жизнью. Уже созданы «таргетные препараты», прицельно повреждающие только клетки, несущие определенные генетические маркеры – *мутации*. Да и побочные эффекты от применения этих средств доставляют больным гораздо меньше неприятностей, чем «стандартная» химиотерапия.

Однако не все так просто. Генетических маркеров и «привязанных» к ним таргетных терапевтических схем настолько много, что врачам приходится нелегко: ведь лечение нужно назначить быстро, и для «перебора» маркеров просто нет времени.

К примеру, клетки достаточно хорошо изученного *колоректального рака* могут нести любой из шести основных генетических маркеров или их комбинацию. Можно назначить лечение в зависимости от результатов исследования опухоли. А можно обойтись без него и назначить химиотерапию, которая поможет большинству пациентов. Это, безусловно, быстрее. Но если больной попадет в группу, не отвечающую на стандартный препарат, экономия времени обернется его потерей.

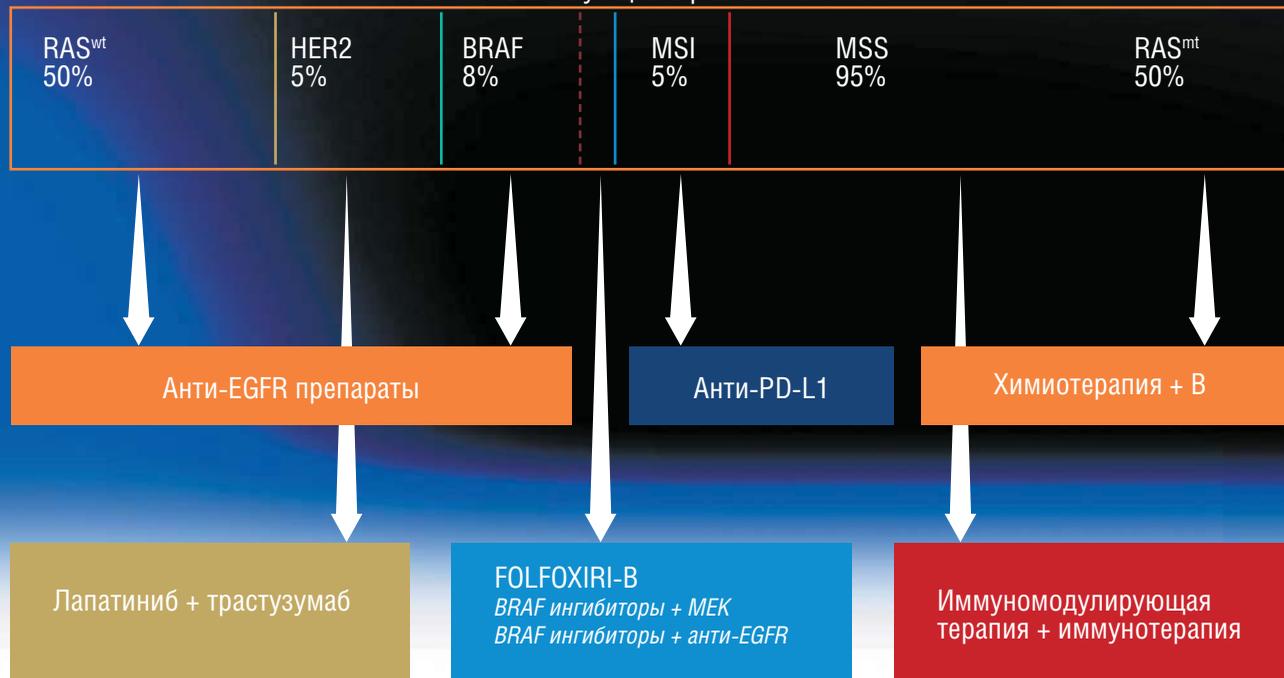
Мониторинг опухоли может продлить жизнь

Иногда бывают ситуации и посложнее. Например, считается, что, если есть мутация в гене BRAF (а она может быть в опухолях самого разного происхождения), надо применять соответствующие ингибиторы BRAF, и все будет хорошо. Но некоторым больным с этой мутацией данное весьма дорогое лечение все равно не помогает, но зато они хорошо отвечают на другие препараты. Узнать о том, какой препарат оптимален, поможет лишь комплексное исследование опухоли, а вовсе не единичный тест на один биомаркер.



БАРАНОВА Анча (Анна) Вячеславовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории функциональной геномики Медико-генетического научного центра РАН (Москва), профессор Школы системной биологии Университета Джорджа Мейсона (Фэрфакс, Вирджиния, США), директор Центра по изучению редких заболеваний и нарушений метаболизма Колледжа науки Университета Джорджа Мейсона, научный директор биомедицинского холдинга «Атлас» (Москва). Автор и соавтор 150 научных работ и 10 патентов

Возможные мутации в раковых клетках



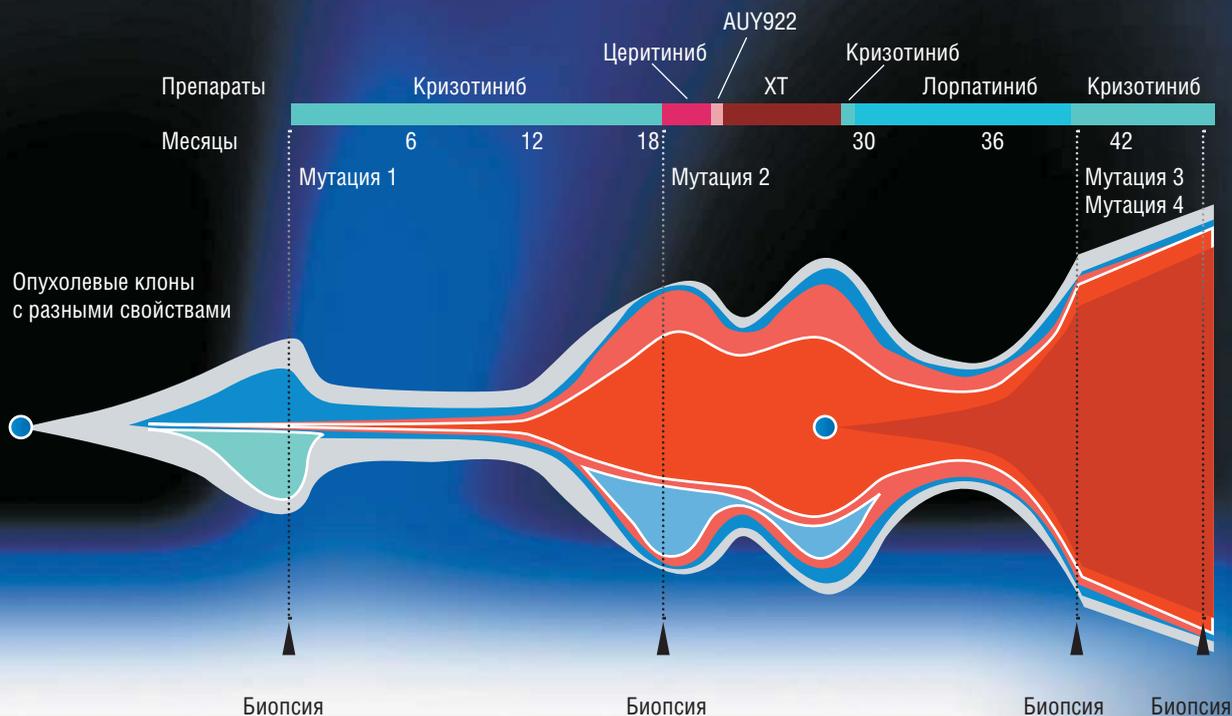
Варианты терапии достаточно хорошо изученного колоректального рака в зависимости от мутации в клетках опухоли По: (Коортан, 2016, с изменениями)

Мы привыкли думать о диагностике опухолей как о чем-то, что связано с моментом первой встречи пациента с врачом-онкологом в соответствии с хорошо известным утверждением: «Ранняя диагностика опухоли – залог успеха в лечении». Казалось бы, если у больного имеются отдаленные метастазы, тут уж не до диагностики, и так все ясно. Однако все с точностью до наоборот: именно рак с метастазами и рецидивами наиболее нуждается в молекулярной диагностике генетических изменений, накопленных опухолью. В результате эволюции опухолевых клонов отдаленные метастазы могут заметно отличаться от первичной опухоли, приобретая чувствительность к той или иной разновидности терапии. В таких случаях лечение таргетным препаратом не приведет к излечению (ведь первичный опухолевый клон не погибнет), но может привести к снижению опухолевой нагрузки, временному прекращению дальнейшего распространения заболевания и/или улучшению качества жизни больного.

Для примера рассмотрим случай 52-летней больной метастатическим *немелкоклеточным раком легкого*, течение болезни которой недавно было описано в одном из лучших медицинских журналов мира – *New England Journal of Medicine*. После начального осмотра и молекулярного исследования опухоли этой больной был назначен «таргетный» препарат *кризотиниб*. Через полтора года лечения в клетках опухоли появилась

новая мутация, и клетки стали устойчивыми к препарату. Из-за этого кризотиниб пришлось отменить – это весьма дорогое лечение перестало быть целесообразным. Но врачи не сдались. Они попробовали сначала экспериментальный препарат, увеличивающий клеточный стресс, – безрезультатно. Затем перешли к «классической» химиотерапии, которая заставила опухоль отступить еще на шесть месяцев, но вновь случился рецидив. В отчаянии врачи снова ненадолго назначили кризотиниб – никакого ответа. И тут подвернулись клинические испытания *лорлатениба*, на которые больная согласилась. И болезнь снова ушла еще на полгода! Следующий рецидив был настолько тяжел, что больная оказалась в отделении интенсивной терапии с почти утраченной функцией печени. К счастью, врачи догадались повторить молекулярное исследование «свежего» опухолевого материала. Оказалось, что в злокачественных клетках возникла новая мутация, восстановившая чувствительность к кризотинибу! Препарат был назначен теперь уже в третий раз. Функция печени быстро восстановилась, метастазы сократились в объеме, и больная прожила еще полгода в состоянии относительного комфорта.

Какие выводы мы можем сделать из этой истории? Их два. Во-первых, молекулярное исследование опухоли стоит проводить после каждого рецидива, какой бы «запущенной» ни казалась болезнь. Во-вторых,



Пример терапии таргетными препаратами больной немелкоклеточным раком легкого. Регулярные биопсии позволяли следить за мутациями в клетках опухоли и оперативно менять тактику лечения. Разными цветами обозначены опухолевые клоны, имеющие разные свойства. Нередко химиотерапия убивает основной клон, но при этом могут оставаться устойчивые к данной терапии минорные клоны, которые впоследствии дают рецидив болезни. По: (Shaw et al., 2016, с изменениями)

опора на многократную молекулярную диагностику способна значительно продлить жизнь больного путем многократного, научно обоснованного «перевода» с одного препарата на другой, так, чтобы лечение все время оставалось оптимизированным. Описанная выше больная прожила четыре года после установки диагноза, в то время как средняя выживаемость при метастатическом немелкоклеточном раке легкого составляет всего восемь месяцев.

Сторонники и противники

Казалось бы, на фоне таких побед онкология должна стать практически точной наукой. Но пока этого не случилось. Во-первых, потому что мир таргетной терапии развивается настолько быстро, что повседневная клиническая практика просто не поспевает за постоянно усложняющимися терапевтическими схемами и сопутствующими им молекулярными исследованиями опухолей. А во-вторых, в руках врачей и молекулярных генетиков находятся жизни людей: в области онкологии цена как ошибки, так и упущенного времени чрезвычайно велика.

Именно поэтому в лучших научных и медицинских журналах мира ведутся полемические битвы о том,

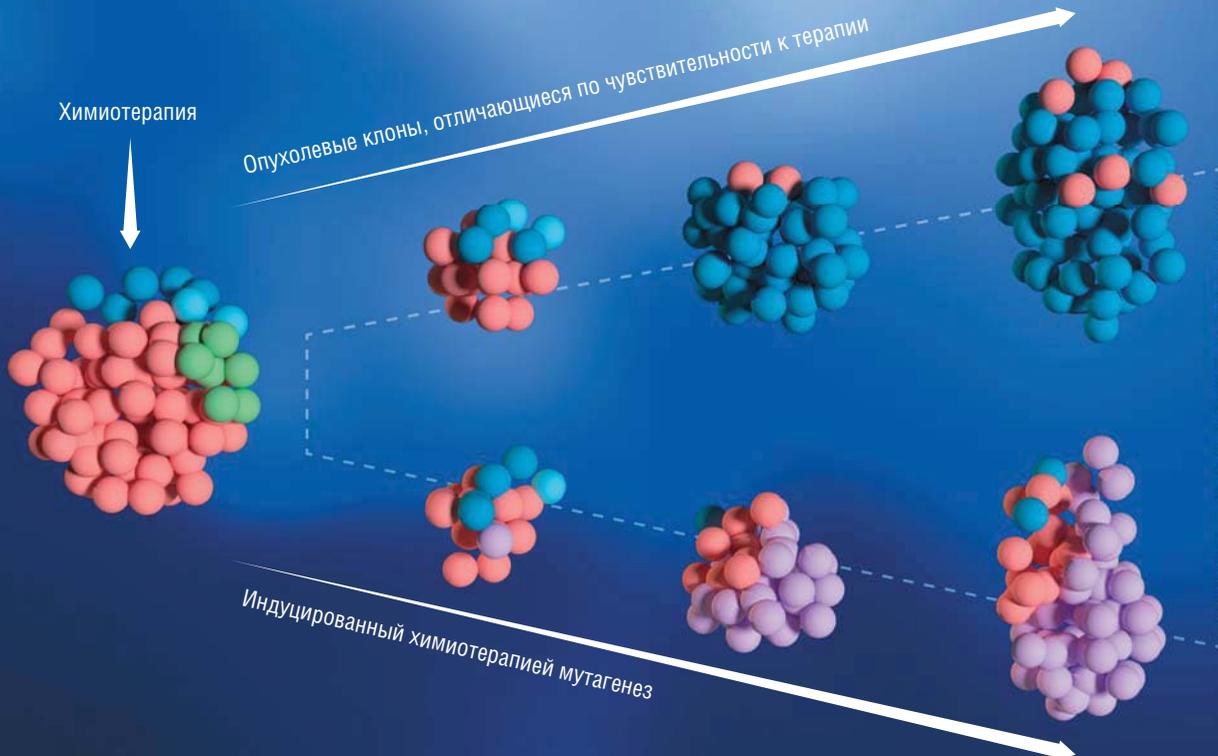
какие результаты исследований стоит как можно скорее внедрить в клиническую практику, а какие – пока отложить. Результаты, полученные в некоторых исследованиях, противоречат друг другу. Например, одна группа ученых убедительно показывает, что для большинства больных с отдаленными метастазами правильный подбор таргетной терапии помогает затормозить развитие болезни, а другая – что в выигрыше оказываются лишь отдельные пациенты, а для большинства переход на эти продвинутые препараты, к сожалению, не приводит к увеличению выживаемости. Такие противоречия, зачастую объяснимые разницей в общем состоянии больных или особенностями их опухолей, всем «сбивают настройки». Именно поэтому с единым взглядом на перспективы «точной» онкологии не могут определиться даже авторы престижнейшего *Nature*.

Итак, противники «точной» онкологии утверждают, что использование таргетных препаратов в лучшем случае лишь незначительно увеличивает продолжительность жизни онкологического больного, но при этом такие лекарства весьма дороги. Встает вопрос: стоит ли тогда тратить время, деньги и человеческие ресурсы?

Сторонники таргетной терапии рассуждают иначе. Ведь даже в случаях, когда таргетные препараты не смогли продлить жизнь больного, они улучшили ее

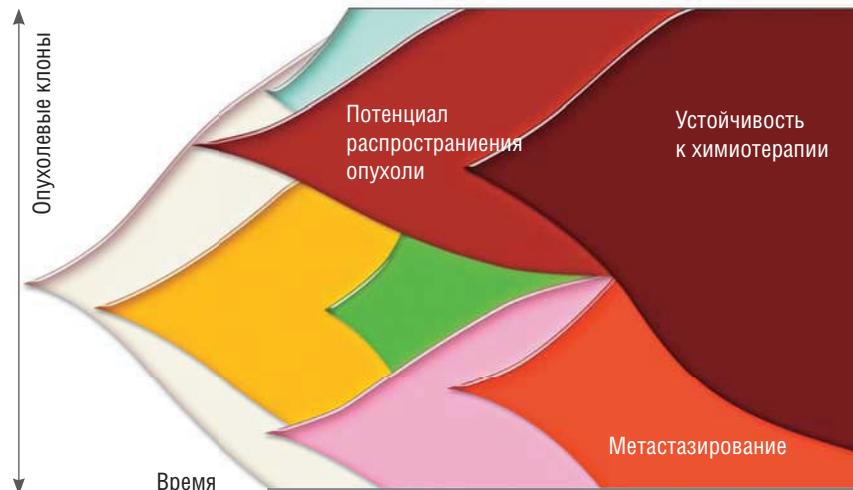


С единым взглядом на перспективы «точной» онкологии определиться не могут даже авторы престижнейшего *Nature*



Химиотерапевтические препараты убивают опухоль, но не всю. С одной стороны, не все клоны опухолевых клеток к ним чувствительны, и именно эти клоны несмотря на лечение выживают и размножаются. С другой стороны, химиотерапевтические препараты сами по себе являются мутагенами и могут провоцировать изменения в геноме раковых клеток и возникновение новых опухолевых клонов

Развитие опухоли начинается с того, что в организме образуются раковые клетки, которые не подвергаются разрушению клетками иммунной системы и начинают размножаться (пролиферировать). Опухоль проходит через несколько стадий своего развития, распространяется по организму, образуя метастазы, а в процессе попыток ее уничтожить образует клоны клеток, нечувствительных к терапии



качество. Как правило, таргетный препарат – это таблетка, которую можно принимать в домашних условиях, а общая химиотерапия – это внутривенные вливания в дневном стационаре или онкологической клинике, где больному и стены ежедневно напоминают о его ужасной проблеме. Да и масштаб побочных эффектов у таргетных препаратов и у лекарственных средств «общего действия», просто несопоставим, так как обычная химиотерапия бьет без разбору все быстро делящиеся клетки организма, включая кроветворные, клетки слизистых и т. п. И трудно не согласиться с тем, что качество последнего года или двух жизни больного – это очень важно.

Как выиграть время?

Что же конкретно предлагает современная «точная» онкология? Для пациента и его семьи диагноз «опухоль» всегда неожиданность, часто требующая быстрых действий, при которых на «пошаговую» диагностику просто нет времени. «Точная» онкология позволяет получить полное описание всех молекулярных особенностей опухоли у конкретного больного и, тем самым, заменить неизбежный вопрос «Доктор, насколько страшна моя опухоль?» на «Доктор, а какова моя опухоль?». Это позволит лечить не абстрактный среднестатистический, к примеру, «рак молочной железы», а конкретную опухоль, возникшую у конкретной пациентки, с учетом как ее собственного генома, определяющего уровень токсичности каждого противоопухолевого препарата именно для нее, так и «слабых мест» размножающихся в ее теле злокачественных клеток.

Максимальное облегчение работы врача по выбору оптимального режима терапии достигается путем диагностики молекулярных особенностей опухоли, основанной на сочетании методов высокопроизводительного секвенирования, флуоресцентной гибри-

дизации *in situ* (FISH), микросателлитного анализа и хорошо знакомой онкологам иммуногистохимии. Секвенирование позволяет «поймать» мутации, даже если они присутствуют не во всех клетках опухоли, а лишь в некоторых – именно тех, которые способны дать рецидив. FISH выявляет хромосомные перестройки, микросателлитный анализ – степень нарушения системы репарации ДНК, а иммуногистохимия – белковые биомаркеры, расположенные на поверхности, в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток.

В области «точной» онкологии работают немало зарубежных компаний, наиболее известной из которых является *Caris* со своим продуктом *Molecular Intelligence*. Конечно, для российских врачей и для онкобольных, находящихся под давлением необходимости быстрого принятия терапевтического решения, работа с иностранной компанией, в том числе пересылка биологического материала, полученного при биопсии, нередко является непосильной задачей. К счастью, в России недавно был создан отечественный тест для оценки молекулярного профиля опухоли в рамках «точной» онкологии, ни в чем не уступающий зарубежному, а по скорости исполнения – даже значительно его превосходящий. И это не удивительно, так как послеоперационный тканевый блок не нужно пересылать за границу.

Биомедицинский холдинг «Атлас» предлагает тест *Solo*, позволяющий быстро выявить индивидуальные молекулярные особенности как первичных, так и метастазирующих опухолей, узнав о которых, лечащий врач сможет применить тот или иной препарат таргетной терапии, а значит, персонализировать лечение. Более того, такое молекулярное исследование позволит заранее оценить потенциальную эффективность более 50 препаратов до начала лечения, что поможет выиграть ценнейший ресурс в борьбе против рака – время.

solo
Результаты исследования

Дата Рождения 04.08.1966 Дата исследования 19.09.2016
 Пол Мужской ID 9548-5762

ДИАГНОЗ
 Рак прямой кишки (аденокарцинома)

 **ПОТЕНЦИАЛЬНО ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ**

ЛЕКАРСТВО	БИОМАРКЕР	УРОВЕНЬ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ
Панитумумаб	KRAS NRAS	I
Ниволумаб	MSI	III

 **ПОТЕНЦИАЛЬНО НЕЭФФЕКТИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ**
 Тростузумаб, Вемурафениб, Аспирин, Цетуксимаб

 **ПРЕПАРАТЫ С ПОВЫШЕННОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТЬЮ**
 5-Фторурацил

Первая страница отчета по проведению молекулярного исследования опухоли. Здесь отражены самые главные из полученных результатов – только те, что необходимы врачу для принятия быстрого решения, <http://solo.atlas.ru/>

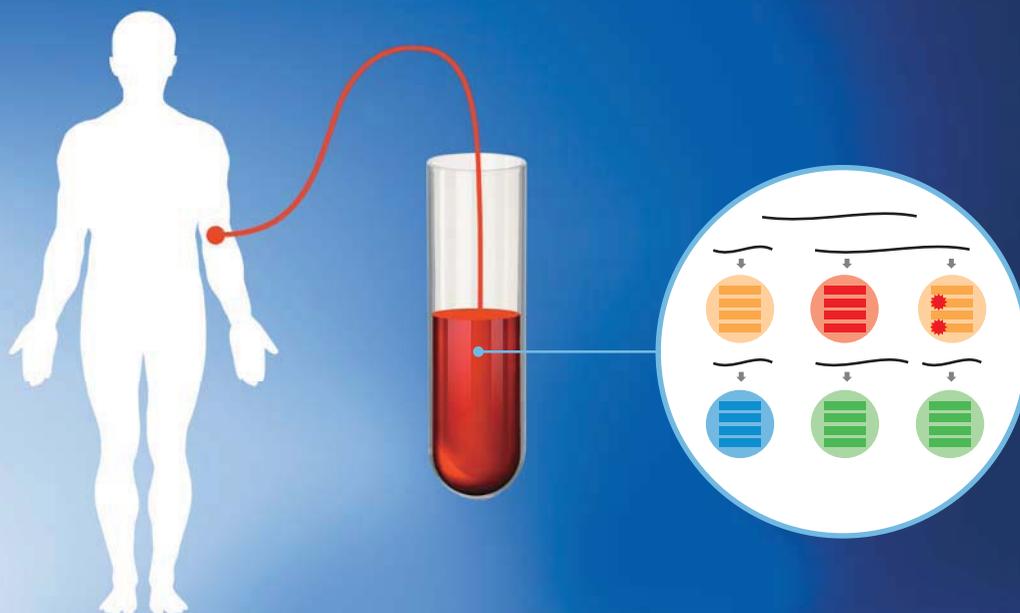
Важно отметить, что для некоторых пациентов тест *Solo* не может быть рекомендован. Если после стандартного анализа об опухоли уже известно, какая именно терапия наиболее эффективна, и врач не стоит перед трудной проблемой выбора, то делать полное молекулярное исследование смысла нет. Однако тому же самому пациенту с «простой» опухолью исследование *Solo* может понадобиться позже, в случае рецидива. В «Атласе» полный цикл исследования, от получения послеоперационных заформалинированных тканевых блоков до выдачи результатов, занимает не больше трех недель. Врач и пациент получают подтверждение начального диагноза, описание набора мутаций, которые присутствуют в генах, определяющих опухолевую прогрессию, а также других биомаркеров потенциальной эффективности или, наоборот, неуспешности различных таргетных и традиционных химиотерапевтических средств с подробным обоснованием выводов и результатами всех проведенных анализов.

Но есть и еще более хорошие новости. В настоящее время команда «Атласа» полным ходом ведет работы по переводу той части теста *Solo*, что выявляет мутации в опухолевых клетках, с послеоперационных тканевых

блоков на так называемую «жидкостную биопсию», представляющую собой простой забор крови из вены. Дело в том, что в крови человека имеется достаточно свободной, внеклеточной ДНК, попадающей туда из всех тканей нашего организма. При наличии опухоли внеклеточная ДНК содержит и фрагменты нуклеиновых кислот, секретируемых злокачественными клетками. При секвенировании внеклеточной ДНК эти ДНК-фрагменты «бросаются в глаза» именно потому, что содержат мутации, нехарактерные для нормальных клеток. Именно эти мутации и нужны молекулярным онкологам, чтобы определиться с выбором таргетного препарата.

Итак, в скором будущем больным для сбора биопсийного материала уже не надо будет обращаться к хирургу – достаточно будет простого визита к медсестре для сдачи крови.

Будем надеяться, что «точная» онкология получит широкое распространение и поможет если не победить рак, то хотя бы значительно облегчить жизнь больных, а также их родных и близких.



Жидкая биопсия основана на детекции очень малых количеств ДНК, высвобождаемых клетками опухоли в кровотоки. Отличить ДНК клеток опухоли от внеклеточной ДНК неракового происхождения можно по наличию в ней специфичных мутаций

Литература

Ivanov M., Laktionov K., Breder V. et al. Towards standardization of next-generation sequencing of FFPE samples for clinical oncology: intrinsic obstacles and possible solutions // *J Transl Med.* 2017. V. 15. N. 1. P. 22.

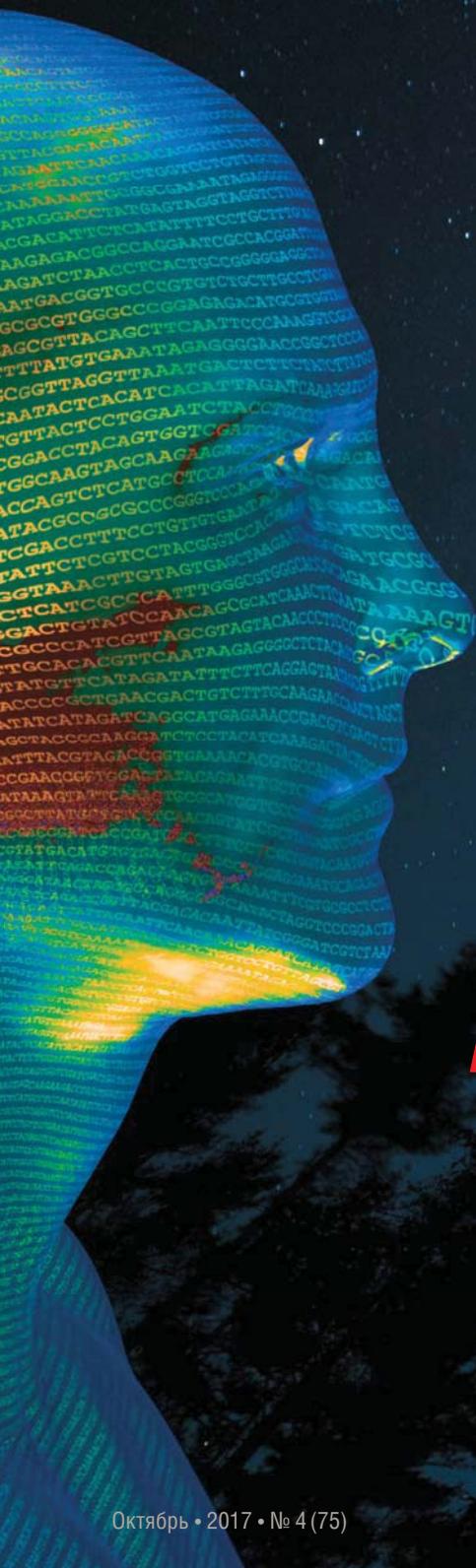
Ivanov M., Baranova A., Butler T. et al. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation // *BMC Genomics.* 2015. V. 16 (Suppl. 13). S 1. P. 1–12.

Messerschmidt J.L., Bhattacharya P., Messerschmidt G.L. Cancer Clonal Theory, Immune Escape, and Their Evolving Roles in Cancer Multi-Agent Therapeutics // *Curr Oncol Rep.* 2017. V. 19. N. 10. P. 66.

Schallenberg S., Merkelbach-Bruse S., Buettner R. Lung cancer as a paradigm for precision oncology in solid tumours // *Virchows Arch.* 2017. [Epub ahead of print].

Amirouchene-Angelozzi N., Swanton C., Bardelli A. Tumor Evolution as a Therapeutic Target // *Cancer Discov.* 2017. [Epub ahead of print].

Sharma P.S., Sharma R., Tyagi T. Receptor tyrosine kinase inhibitors as potent weapons in war against cancers // *Curr Pharm Des.* 2009. V. 15. N. 7. P. 758–776.



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ ДЕЙСТВИТЕЛЕН С РОЖДЕНИЯ,

или Гадание на генах

В течение всей истории человечества люди стремились предсказать свое будущее, начиная от гаданий на внутренностях жертвенных животных до ворожбы на картах и кофейной гуще. Открытие тайн генетического кода поставило некоторые из этих прогнозов на твердую научную основу. Оказалось, что здоровье и продолжительность жизни каждого из нас во многом предопределены уникальной комбинацией из определенных генных вариантов, доставшейся нам в «наследство» от родителей. К тому же, в отличие от роста, мышечной массы и шевелюры, генотип человека – это единственное, что остается неизменным на протяжении всей его жизни. И хотя конкретная реализация наследственного потенциала будет зависеть от внешней среды, результаты «гадания на генах» могут указать на скрытые подводные камни и помочь составить максимально безопасный маршрут в беспокойном житейском море

Ключевые слова: генетические полиморфизмы, персонализированная медицина, нутригенетика, диетология.
Key words: genetic polymorphisms, personalized medicine, nutrient genetics, dietology

© Г. И. Лифшиц, Н. В. Кох, 2017



ЛИФШИЦ Галина Израилевна – врач-кардиолог высшей категории, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией персонализированной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), профессор кафедры внутренних болезней и ученый секретарь Института медицины и психологии Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор 153 научных работ



КОХ Наталья Викторовна – терапевт-генетик, научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 29 научных работ

Идея, что разных людей нужно лечить по-разному, имеет тысячелетнюю историю: еще Гиппократ считал, что нужно «давать разные лекарства разным пациентам и то, что хорошо для одного, может не быть полезным для другого». Однако этот принцип не сразу прижился в привычной нам классической медицине, которая, в отличие от традиционной, не придавала большого значения индивидуальным особенностям пациента, таким как конституция, образ жизни, питание и физическая активность, а также характер протекания болезни.

Однако с конца прошлого века в литературе все чаще стал встречаться термин *персонализированная медицина*. Началось формирование новой модели организации медицинской помощи, в основу которой легло представление о пациенте как уникальном организме со своими генетическими, физиологическими и биохимическими характеристиками. И их надо обязательно учитывать, разрабатывая оптимальную схему диагностики, лечения или профилактики болезней для конкретного человека.

В персонализированной медицине сегодня можно выделить несколько важных составляющих. Среди них – *индивидуальный мониторинг здоровья* с помощью современных медицинских цифровых технологий, включая



Препарат варфарин – не прямой антикоагулянт, который понижает свертываемость крови, жизненно необходим при нарушениях сердечного ритма, венозных тромбозах и тромбоэмболиях, а также после кардиохирургических операций. Назначают его на длительный срок, при этом прием лекарства чреват развитием различных осложнений, в первую очередь кровотечениями. Индивидуальная чувствительность к варфарину определяется генотипом, в частности полиморфизмом гена VKORC1, который кодирует белок клеток печени, ответственный за реактивацию витамина К. В связи с этим назначаемая доза варфарина для больных с разными структурными вариантами этого гена также должна различаться (Лифшиц и др., 2008). По данным *Pharmacogenomics Knowledge Database*

специальные приложения для мобильных устройств и компактные персональные анализаторы. Это позволяет любому человеку рутинно, не обращаясь к помощи здравоохранения, ежедневно контролировать важнейшие физиологические и метаболические параметры своего организма, а накопление такой информации может помочь в составлении индивидуальной программы лечения и поддержания здоровья.

Еще одна составляющая – *клеточные технологии*, основанные на использовании собственных стволовых клеток пациента, которые можно превращать в клетки различных органов и тканей. Такие технологии расширяют возможности регенеративной медицины, их можно использовать для создания индивидуальных вакцин против онкологических заболеваний и т. п. Клинические перспективы этого направления безграничны, однако применение их в медицинских целях сегодня имеет ряд этических и законодательных ограничений.

И все-таки решающим шагом в появлении современной персонализированной медицины стало развитие геномики и генодиагностики, которые легли в основу еще одного мирового тренда – *предсказательной медицины*.

Смысл этого подхода в том, чтобы на основе анализа ДНК выявить предрасположенность конкретного человека к тому или иному заболеванию, оценить особенности его метаболизма, адаптивные возможности и т. п. Безусловно, речь при этом обычно идет лишь о вероятности (риске), так как в развитии любой патологии огромную роль играют внешние факторы. Как показали исследования на близнецах, это относится и к таким мультифакторным заболеваниям, как сахарный диабет, бронхиальная астма, ишемия сердца, атеросклероз и т. д. Тем не менее генетический анализ дает возможность

получить научно взвешенные рекомендации по поддержанию здоровья и внести необходимые коррективы в привычный образ жизни.

Как это работает

Сегодня термином «генетический паспорт» никого не удивишь. И это тем более поразительно, если вспомнить, что амбициозный международный проект по расшифровке первого генома человека, стартовавший в конце прошлого века, обошелся примерно в 3 млрд долларов. Еще в начале нашего столетия подобный анализ оценивался примерно в 300 тыс. долларов, так что медицинские перспективы генодиагностики в то время выглядели достаточно туманными. Однако появление высокотехнологичных систем секвенирования генома привело к настоящему обвалу цен, устремившихся к заветной цифре в одну тысячу долларов.

Кстати сказать, обычный индивидуальный генетический паспорт сегодня очень далек от полной инвентаризационной описи всего генома, и не только из-за его стоимости. Не менее важно то, что роль огромного числа генов в патогенезе болезней еще до конца не выяснена, а ряд редких генных мутаций функционально не описан.

Тем не менее исследования отдельных генов и генных локусов активно ведутся по всему миру, и соответствующая информация растет, как снежный ком. Когда обнаруживаются мутации, связанные с определенным заболеванием, проводят исследования частоты их встречаемости у здоровых и больных людей для оценки их прогностической значимости. На сегодня охарактеризовано уже несколько тысяч таких генных вариантов, связанных с риском возникновения

внушительного ряда патологий. Среди них: сахарный диабет 2-го типа, сердечно-сосудистые заболевания, тромбоз, остеопороз, гормональные расстройства, репродуктивные нарушения... Известен и целый ряд мутаций, специфичных для онкологических заболеваний, и число их будет расти, так как в онкогенез могут вовлекаться десятки и сотни самых разных генов.

Изучение генетического профиля помогает подобрать более эффективную лекарственную терапию, так как для многих фармакологических препаратов уже найдены генетические маркеры чувствительности и безопасности. Например, установлено, что женщинам с генетически детерминированной склонностью к повышению вязкости крови нужно с осторожностью использовать гормональные контрацептивы, так как они повышают риск развития тромбозов. Как показали наши данные, в Новосибирске примерно пятая (!) часть больных тяжелыми сердечно-сосудистыми заболеваниями невосприимчивы к антиагрегантному препарату *клопидогрелу*, который они принимают по назначению врача.

Как можно получить свой генетический паспорт? Сейчас такую услугу (платную) предоставляют ряд медицинских учреждений и клиник. Например, в нашем городе (Новосибирске) изучением роли генетических нарушений в патогенезе болезней и разработкой новых методов генетического анализа занимается лаборатория персонализированной медицины Центра новых медицинских технологий (ЦНТМ) Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а уже апробированные решения внедряются в сети медицинских клиник центра. На сегодняшний день здесь предлагается более 50 генетических панелей, самая большая из которых включает более 200 генов – практически все известные маркеры потенциальных наследственных заболеваний и чувствительности к лекарствам. Все панели очень «широкие», поэтому результаты анализов позволяют дать достаточно целостную картину, а не отдельные разрозненные факты.

Сама процедура прохождения теста очень проста: нужно сдать обычный образец крови из вены. Результаты генетических анализов поступают к нашим терапевтам и генетикам, которые и дают заключение. Для этого используются специальные интерпретирующие

На основе близнецовых исследований и анализа семейных родословных ученые установили, что ожирение имеет наследственный компонент. Позднее, в ходе геномных исследований, были выявлены конкретные полиморфизмы генов, ассоциированные с избыточным весом.

На фото – уличная скульптурная композиция в г. Векшё (Швеция). *Фото Марии Анашиной*

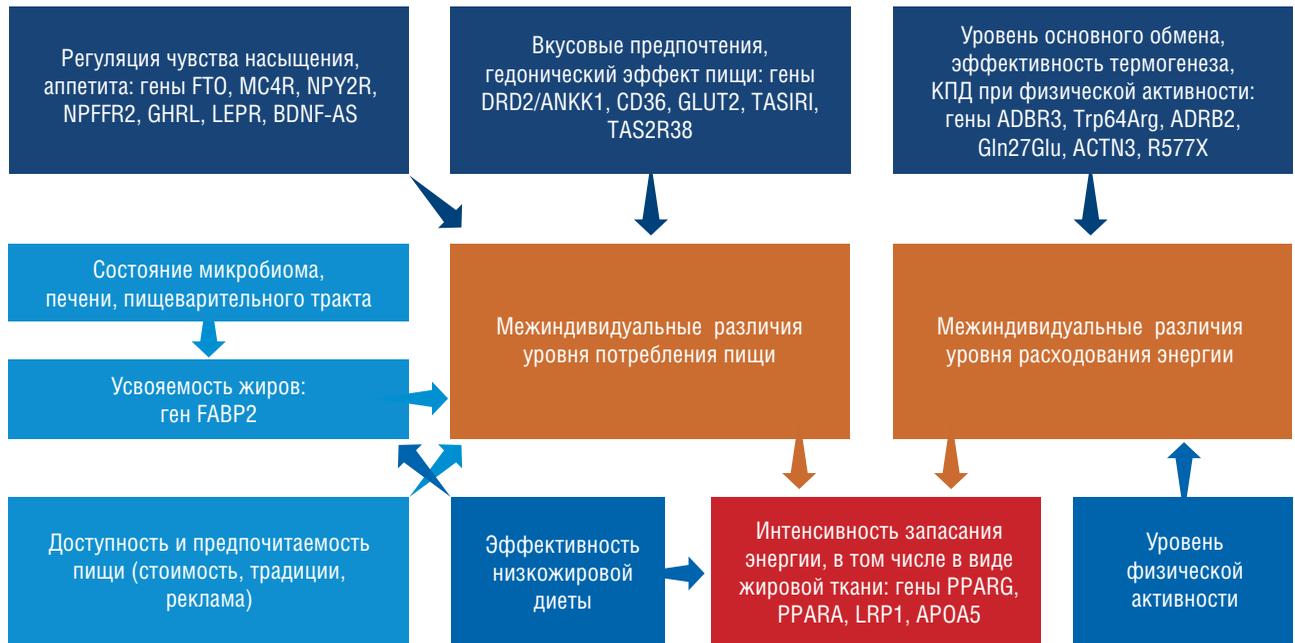
программы для подготовки отдельных блоков информации, которые затем проверяются и объединяются специалистом. Эти программы создавались в течение нескольких лет на основе изучения огромного числа литературных источников, чтобы аккумулировать все научные результаты, имеющиеся в мире по тому или иному вопросу.

Пациент и его лечащий врач получают индивидуальное заключение в виде развернутого описания персональных особенностей. Но на этом их взаимодействие не заканчивается: пациент всегда может получить дополнительную очную или заочную консультацию своего лечащего врача или врачей-генетиков. Такая практика выгодно отличает наш центр (ЦНМТ) от других организаций, которые предлагают своим клиентам просто стандартные наборы рекомендаций для разных генотипов.

Есть ли у вас «право» это съесть?

В последние годы одним из приоритетных направлений лаборатории персонализированной медицины ЦНМТ является *нутригенетика*, изучающая генетические предрасположенности к заболеваниям с учетом потребления тех или иных питательных веществ. На самом деле речь идет об определении рисков, которые лежат на пути к здоровому телу и высокому качеству





Масса тела человека – это результирующая двух процессов: потребления энергии (пищи) и ее расходования. Эти процессы, в свою очередь, регулируются внутренними и внешними факторами. Конечный эффект на метаболизм будет во многом определяться наличием тех или иных функциональных вариантов целого ряда генов

ЗАПРОГРАММИРОВАННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ?

В известной психобиологической модели индивидуальности Р. Клонингера черты темперамента соотносятся с определенными биохимическими системами мозга (Разумникова, 2005).

Люди с высокими значениями по шкале «избегание ущерба» характеризуются тревожностью, застенчивостью, страхом перед опасностью и неизвестностью и не склонны к необдуманным поступкам, связанным с высоким риском. Такое поведение Клонингер связал с серотониновой системой мозга. Исследования показали, что ген, кодирующий рецептор серотонина – белок HTR 2A, действительно имеет полиморфный локус, влияющий на активность передачи сигнала.

Высокие оценки по шкале «поиск новизны» получают импульсивные, раздражительные индивидуумы, склонные нарушать мешающие им правила. Оценки по этому критерию обычно выше у больных с различными формами патологических зависимостей (наркоманией, алкоголизмом, игроманией). Выраженность этих проявлений зависит в том числе от унаследованной версии гена DRD 2, кодирующего рецептор к дофамину – «гормону удовольствия». Носители «патологического» варианта гена (около 5% популяции) с низким уровнем этого гормона могут начать переедать в стрессовых ситуациях при отсутствии чувства голода, что приводит к появлению лишнего веса. Схожим эффектом обладает полиморфный ген опиоидного рецептора OPRM1 (van den Wildenberg, 2007)

жизни, и возможностей достичь этих целей.

В этой области мы также предлагаем ряд генетических панелей. Самая короткая (11 генетических маркеров) программа дает людям, стремящимся быстро снизить вес и поддерживать здоровый образ жизни, базовое представление о выборе диеты, интенсивности физических нагрузок, риска таких вредных привычек, как курение, и т.п. Есть «промежуточные» программы исследований, призванные отвечать на конкретные вопросы, касающиеся, к примеру, индивидуальной переносимости физической нагрузки. А самая большая панель нутригенетических тестов включает уже 79 параметров, и заключение с рекомендациями, которое получает пациент, занимает 60–70 страниц.

Многих к таким программам привлекает простое желание

КОФЕ: ПИТЬ ИЛИ НЕ ПИТЬ?

Один из важнейших компонентов кофе – кофеин, обладающий тонизирующим эффектом, поэтому кофе кратковременно улучшает внимание, особенно когда человек утомлен. А его систематическое употребление может улучшить чувствительность к инсулину и снизить риск развития сахарного диабета 2-го типа. Есть данные, что кофе также значительно снижает риск развития цирроза печени и рака молочной железы. К нежелательным эффектам кофеина относят способность влиять на количество сердечных сокращений (может вызвать тахикардию) и сосудосуживающий эффект. Кроме того, кофеин способствует выведению костного кальция, а дубильные вещества кофе не показаны при язвенной болезни и обострении хронического гастрита. Польза и вред этого любимого напитка миллионов людей часто служит предметом спора не только среди простых обывателей, но и ученых. Но, может быть, в данном случае важнее не «что», а «кому» и «сколько»?

Кофеин выводится из организма печенью. Скорость его метаболизма, как и многих других соединений, определяется особым ферментом – цитохромом CYP1A2. Ген, кодирующий этот фермент, имеет 3 разных варианта, связанных с разной скоростью метаболизма кофе: «F» – быстрый, «C» – медленный, «A» – промежуточный. Так как у каждого человека гены представлены двумя копиями – от отца и матери, среди людей, соответственно, встречается 6 генетических комбинаций.

Носителям варианта «F» употребление кофе не противопоказано, а в некоторых случаях даже желательно. И, напротив, кофе не рекомендуется при генотипе «C», так как повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Важно, что фермент CYP1A2 играет ключевую роль в метаболизме не только кофе, но и эстрогенов – женских половых гормонов. Повышенное (свыше 2 чашек в день) потребление кофе у женщин – носителей «быстрого» варианта гена – конкурентно ингибирует метаболизм эстрогенов и снижает их проканцерогенный эффект. Это было подтверждено более поздним развитием болезни у пациенток с раком молочной железы (Bageman *et al.*, 2008).

Интересно, что индивидуальное восприятие вкуса кофе также генетически детерминировано. Речь идет о вкусовых рецепторах, воспринимающих «горечи», в том числе антиоксидантные вещества кофе с горьковатым привкусом. Например, ген, кодирующий рецептор TAS2R38, встречается в нескольких вариантах. Носители варианта AVI/AVI чаще демонстрируют любовь к кофе, чем люди с генотипом PAV/PAV, которые обычно добавляют в кофе молоко, сахар и другие добавки для снижения ощущения горечи. А носители варианта AVI/AVI чаще употребляют брокколи и другие виды капусты. Эти «любители кофе и брокколи» характеризуются более низким уровнем в крови глюкозы и С-реактивного белка – маркера воспалительных заболеваний (Mikołajczyk-Stecyna *et al.*, 2017)

«похудеть», но на самом деле главное здесь – это сохранение и улучшение здоровья. Дело в том, что избыточная масса тела и ожирение – это не только эстетическая проблема, но и значимый фактор риска развития атеросклероза, артериальной гипертензии и других многофакторных заболеваний. Избыточный вес негативно влияет и на эндокринную систему, провоцируя развитие сахарного диабета II, а также может стать причиной женского и мужского бесплодия.

Все эти признаки – абдоминальное ожирение, устойчивость тканей к инсулину, повышение уровня глюкозы и липидов, рост артериального давления – объединены в понятие *метаболический синдром*. Свой вклад в развитие этой «болезни века», помимо погрешностей в питании и малоподвижного образа жизни, вносят генетические факторы.

Избыточный вес у многих людей возникает в силу особенностей пищевого поведения: позднего насыщения, раннего возникновения чувства голода, склонности к частым перекусам. Исчезновение чувства голода после приема пищи связано в том числе и с нейроэндокринными реакциями – выделением

активных веществ, влияющих на центр насыщения головного мозга. При разных вариантах генов, влияющих на эти процессы, скорость возникновения чувства сытости также может различаться.

Например, мутации в генах FTO и MC4R определяют разную восприимчивость к *лептину* – гормону, концентрация которого во время приема пищи возрастает и который влияет на чувство насыщения через регуляцию аппетита в головном мозге. Людям с неблагоприятными вариантами этих генов трудно контролировать объем съеденного, что и определяет склонность к перееданию.

Возникновение чувства голода – это сложный процесс, регулируемый в том числе и уровнем особых орексигенных белков, таких как *грелин*. Один из вариантов полиморфного гена GHRL, кодирующего этот белок, отвечает за высокий уровень грелина, что провоцирует появление «раннего» чувства голода. Другие варианты этого гена ассоциированы с отдельными компонентами метаболического синдрома, включая высокий уровень холестерина, систолическое кровяное давление и др.

Как известно, провоцирующим фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний и появления

СПОРТ И ГЕНЫ

Генетическая предрасположенность к формированию спринтерских и стайерских качеств обусловлена наличием в мышце разных мышечных волокон. Белые волокна рассчитаны на высокую скорость и силу сокращения, но при этом они не могут сокращаться долго. Важным их компонентом является белок альфа-актин-3. Ген, кодирующий этот белок, встречается в разных вариантах, и при наличии варианта «X» белок вообще не образуется. Исследование на олимпийских спортсменах показало, что аллель «X» чаще встречается у стайеров, а вариант «XX» вообще не был обнаружен у спринтеров.

Результативность физических нагрузок в целях снижения веса также имеет генетическую подоплеку, связанную с рецепторами к гормону адреналина. При физических нагрузках мышцам требуется больше кислорода и энергии для активного сокращения, что и достигается работой адренергической системы. Адреналин и норадреналин, связываясь со своими рецепторами, стимулируют повышение частоты сердечных сокращений, а также мобилизуют «запасы» жиров и углеводов. Разные варианты этих рецепторов обеспечивают разнообразие эффектов, наблюдаемых при физической нагрузке. В зависимости от генотипа человека можно отнести к «энергозатратному» или «энергосберегающему» типам. В первом случае добиться сжигания излишних энергетических запасов можно с помощью обычных физических упражнений, во втором же случае потребуются более интенсивные тренировки

избыточной массы тела служит высокое потребление насыщенных («твердых») жиров (сливочного масла, животных жиров и др.). В этом случае высокий риск развития *гиперлипидемии* (повышения уровня липидов в крови) имеют носители определенных вариантов генов, кодирующих белки аполипопротеины, которые стимулируют расщепление жиров, ингибируют синтез липидов в печени, участвуют в производстве и утилизации холестерина. Носителям таких генов особенно важно ограничить потребление гидрогенизированных жиров, входящих в состав маргарина и нарушающих транспорт питательных веществ через клеточные мембраны.

Подобных примеров очень много: «генетические корни» обнаруживаются в 40–70% случаев избыточного веса. Поэтому контроль за содержанием в рационе веществ, вредных или полезных с точки зрения генетической предрасположенности, – один из подходов для профилактики и лечения метаболического синдрома.

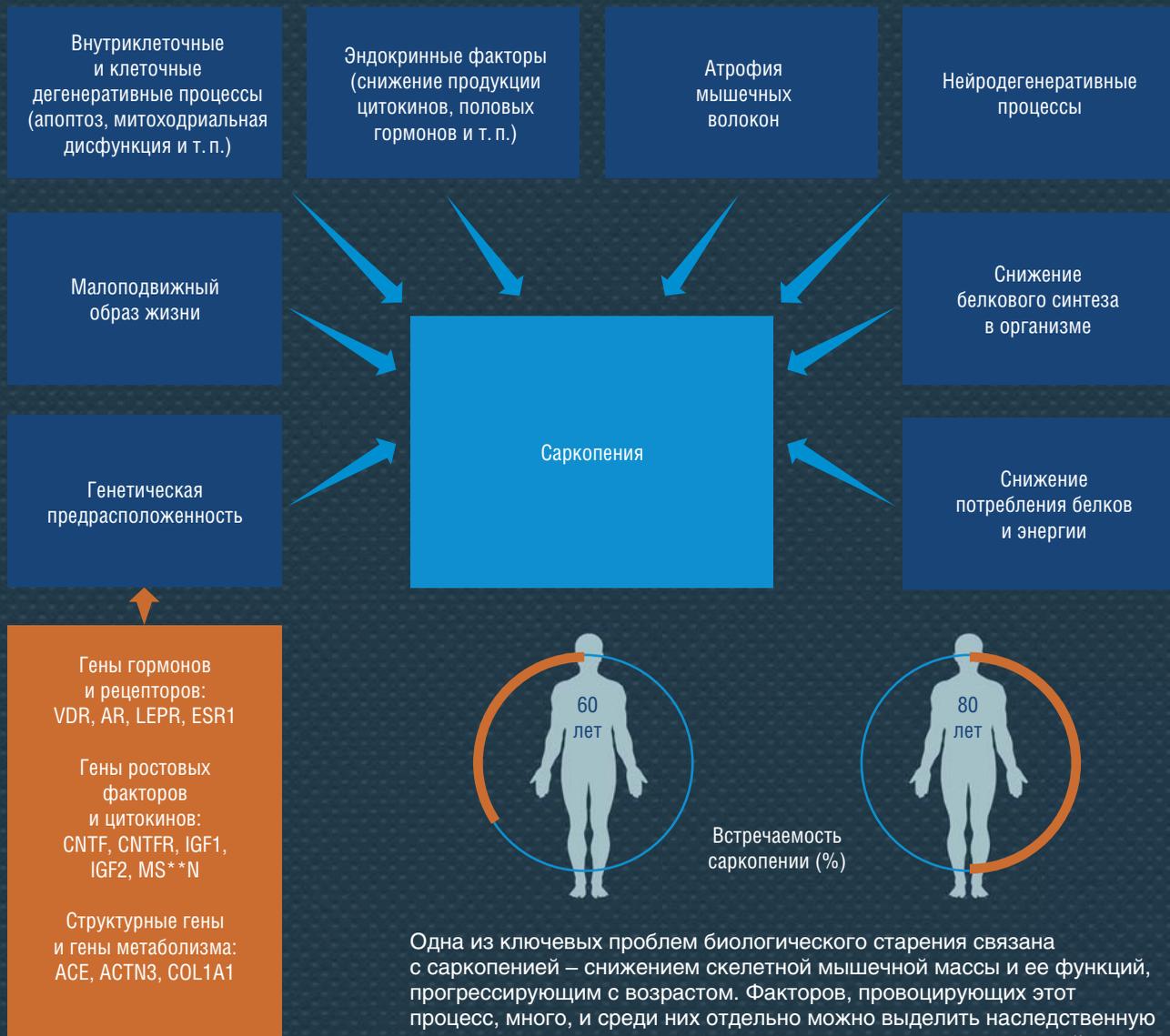
В Центре новых медицинских технологий (Новосибирск) любой человек может получить генетический паспорт с результатами генодиагностики по следующим направлениям: расширенный гемостаз, эндотелиальная дисфункция, артериальная гипертензия, липидный обмен, риск возникновения остеопороза, атопии, рака молочной железы и яичника, а также по нутригеномике и фармакогеномике. Стоимость полной генодиагностики по любому из направлений составляет на сегодня 25 тыс. рублей

Большой плюс генетических исследований в том, что их можно проводить в любом возрасте. Более того, сегодня мы рекомендуем пройти тесты на наследственные заболевания всем потенциальным родителям. Генетическая экспертиза показана и детям в случае, если есть отклонения в здоровье. Seriously же подойти к этой проблеме стоит после 25 лет, потому что болезни в наше время быстро «молодеют», и с наступлением зрелого возраста человек уже должен жить осознанно, соблюдая превентивные меры безопасности. Таким образом можно отодвинуть на 10–15 лет реализацию даже выраженной наследственной предрасположенности к той или иной болезни.

Одна из наших последних идей, которая еще находится в разработке, – создание генетического теста по выявлению предрасположенности к раннему старению, которым мы занимаемся совместно с нашими коллегами из новосибирского Технопарка. Речь идет о выявлении генетических маркеров, которые позволят оценить потенциальную скорость накопления возрастных изменений у конкретного человека.

Сейчас уже известны подобные генетические программы для косметологов, с помощью которых можно определить потенциальную скорость старения кожи. Но, как все понимают, это лишь верхушка айсберга. Ведь стареет не только кожа, но и мозговые структуры, мышцы, кровеносные сосуды. Стареют клетки и белки... Процесс старения – это генеральная финишная линия развития организма.

Первый внятный совместный продукт, посвященный генетическим аспектам старения, должен появиться уже к концу текущего года. Мы надеемся, что в результате этой работы любой желающий сможет узнать свои шансы стать здоровым долгожителем, а в случае выявления предрасположенности к раннему старению – получить персональные рекомендации по продлению активной, полноценной жизни.



Одна из ключевых проблем биологического старения связана с саркопенией – снижением скелетной мышечной массы и ее функций, прогрессирующим с возрастом. Факторов, провоцирующих этот процесс, много, и среди них отдельно можно выделить наследственную предрасположенность, связанную с изменчивостью ряда важнейших генов, обеспечивающих нормальное функционирование организма. По: (Tan et al., 2012)

Литература

- Кох Н. В., Слепухина А. А., Лифшиц Г. И. Артериальная гипертензия: молекулярно-генетические и фармакологические подходы // Фармакогенетика и фармакогеномика. 2015. № 2. С. 4–8.
- Кох Н. В. и др. Сравнение эмпирического и фармакогенетического подхода в оценке антикоагулянтной терапии // Кардиология. 2015. Т. 55. № 4. С. 57–60.
- Кох Н. В., Лифшиц Г. И., Воронина Е. Н. Возможности анализа полиморфизма генов липидного обмена для выявления факторов риска атеросклероза // Российский кардиологический журнал. 2014. Т. 114. № 10. С. 53–57.
- Лифшиц Г. И., Филипенко М. Л. Лечить не болезнь, а больного // НАУКА из первых рук. 2012. Т. 44. № 2. С. 58–65.
- Лифшиц Г. И., Новикова Я. В. Терапия: персональная доза // НАУКА из первых рук. 2010. Т. 32. № 2. С. 97–99.

Распространенное мнение о том, что «стресс у человека в голове» и достаточно просто расслабиться, чтобы он сам собой исчез, неверно. На самом деле стресс существует объективно, у него есть физические носители – это множество молекул, активность и количество которых может возрастать во время стресса. К счастью, есть и антистрессовые молекулы.

С точки зрения ученого, самое ужасное, что можно сказать про стресс – это то, что у нас пока нет никакого объективного способа его измерить. Измерять количество каждой стресс-молекулы по отдельности нет смысла, потому что у разных людей или в разных случаях может быть, например, большой стресс по молекуле А и маленький по молекуле Б. Нужен какой-то интегральный показатель. А измерять стресс нужно, чтобы мы, наконец, научились понимать, что же происходит с нашим организмом, когда мы переживаем те или иные события

Как измерить СТРЕСС

и для чего это нужно



P звуковая мощность стресса = 160 гБ

U электрическое напряжение стресса = 220 В

λ длина стресса = 95 см

Ключевые слова: стресс, окислительный стресс, внеклеточная ДНК, апоптоз, долгосрочный мониторинг здоровья, здоровье здоровых людей, персонализированная медицина, генетическое тестирование
Key words: oxidative stress, cell-free DNA, biosensors, apoptosis, longitudinal monitoring, stress, personalized medicine, genetic tests

© А. В. Баранова, 2017



Молекулярную основу стресса составляют активные формы кислорода: это высокорективные соединения, повреждающие клеточные макромолекулы – белки и ДНК. Стресс пропорционален уровню активных форм кислорода, который может увеличиваться или снижаться в зависимости от общего состояния клетки. Заметьте, здесь мы говорим о клеточном стрессе, однако у стресса в нашем обычном понимании, т. е. классического стресса по концепции Г. Селье, тоже есть физические носители. Эти носители вызывают рост уровня активных форм кислорода, а значит, и клеточный стресс.

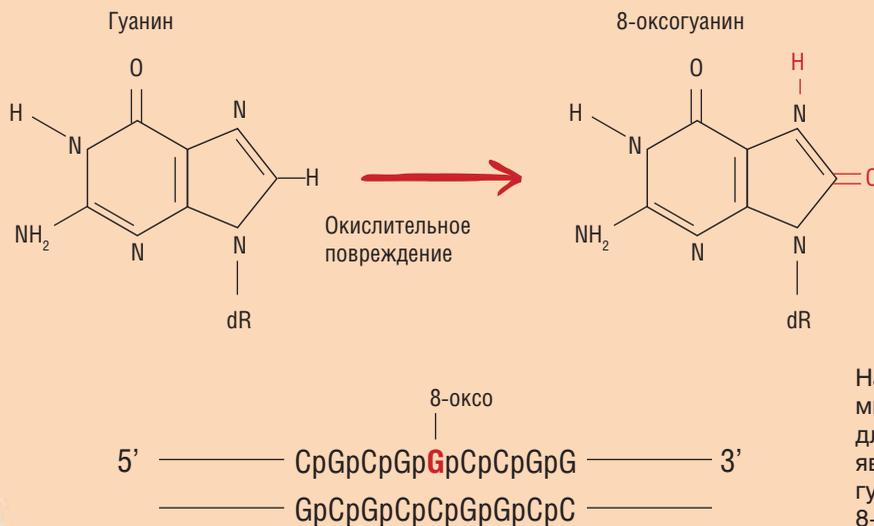
Такой стресс «распределяется» в нашем теле неравномерно. Иногда его можно наблюдать в одной отдельно взятой ткани, при этом другая остается в полном порядке. Например, гипоксическое состояние, сопровождающее мигрень, является стрессом для тканей мозга, а вот ноги при этом могут и не страдать. Но если человеку пришлось много бегать без привычки, у него пострадают ноги, но не голова.

Боль – это тоже стресс. Вообще, если вы чувствуете себя плохо: – вас тошнит или шея болит – значит, у вас стресс, даже если нет видимых повреждений в организме. Скажу больше: если на вас кричит начальник (или свекровь), эти люди наносят тканям вашего мозга вполне реальные повреждения, которые можно измерить количественно. От громкого, эмоционально окрашенного звука в тканях мозга повышаются уровни активных форм кислорода, а от этого, в свою очередь, страдают и нейроны, и питающие их астроциты, и эндотелий кровеносных сосудов. Есть хорошая модель стресса для мыши, когда подопытное животное

БАРАНОВА Анча (Анна) Вячеславовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории функциональной геномики Медико-генетического научного центра РАН (Москва), профессор Школы системной биологии Университета Джорджа Мейсона (Фэрфакс, Вирджиния США), директор Центра по изучению редких заболеваний и нарушений метаболизма Колледжа науки Университета Джорджа Мейсона, научный директор биомедицинского холдинга «Атлас» (Москва). Автор и соавтор 150 научных работ и 10 патентов

на несколько часов сажают в узкую пластмассовую трубку и тем самым обездвиживают. При этом мышья никак не «повреждают» физически, но у нее возникает чудовищный стресс, и если с животным поступить так неоднократно, оно погибнет.

Ученые подбираются к объективной оценке стресса уже давно. Говоря в общем, уровень стресса можно измерить, отслеживая в крови разные активные формы кислорода и другие окислители, поврежденные белки и ДНК, а также различные компоненты наших собственных антиоксидантных систем. К сожалению, каждая из этих молекул, в совокупности называемых *биомаркерами стресса*, отражает какой-то один аспект этого феномена, но не стресс в целом. Кроме того, для объективной оценки каждого из этих параметров, в какой-то степени отражающих общий уровень стресса, надо сдавать кровь в лаборатории, и никто не будет делать это каждый день. Мы нашли способ делать это легко и просто, так, чтобы каждый человек мог ежедневно и ежечасно следить за уровнем стресса в своем организме.



Наиболее чувствительной мишенью в составе ДНК для активных форм кислорода является азотистое основание гуанин, а продукт этой реакции – 8-оксогуанин – считается одним из основных биомаркеров окислительного повреждения ДНК

Окисленная ДНК как маркер стресса

Известно, что в крови присутствует некоторое количество свободно плавающей внеклеточной ДНК. В основном эта ДНК попадает в кровь из клеток, гибнущих в процессе *апоптоза* (запрограммированной клеточной смерти). Количество клеток, подвергающихся апоптозу, и степень поврежденности этой ДНК активными формами кислорода пропорциональны уровню стресса, которому подверглись наши клетки.

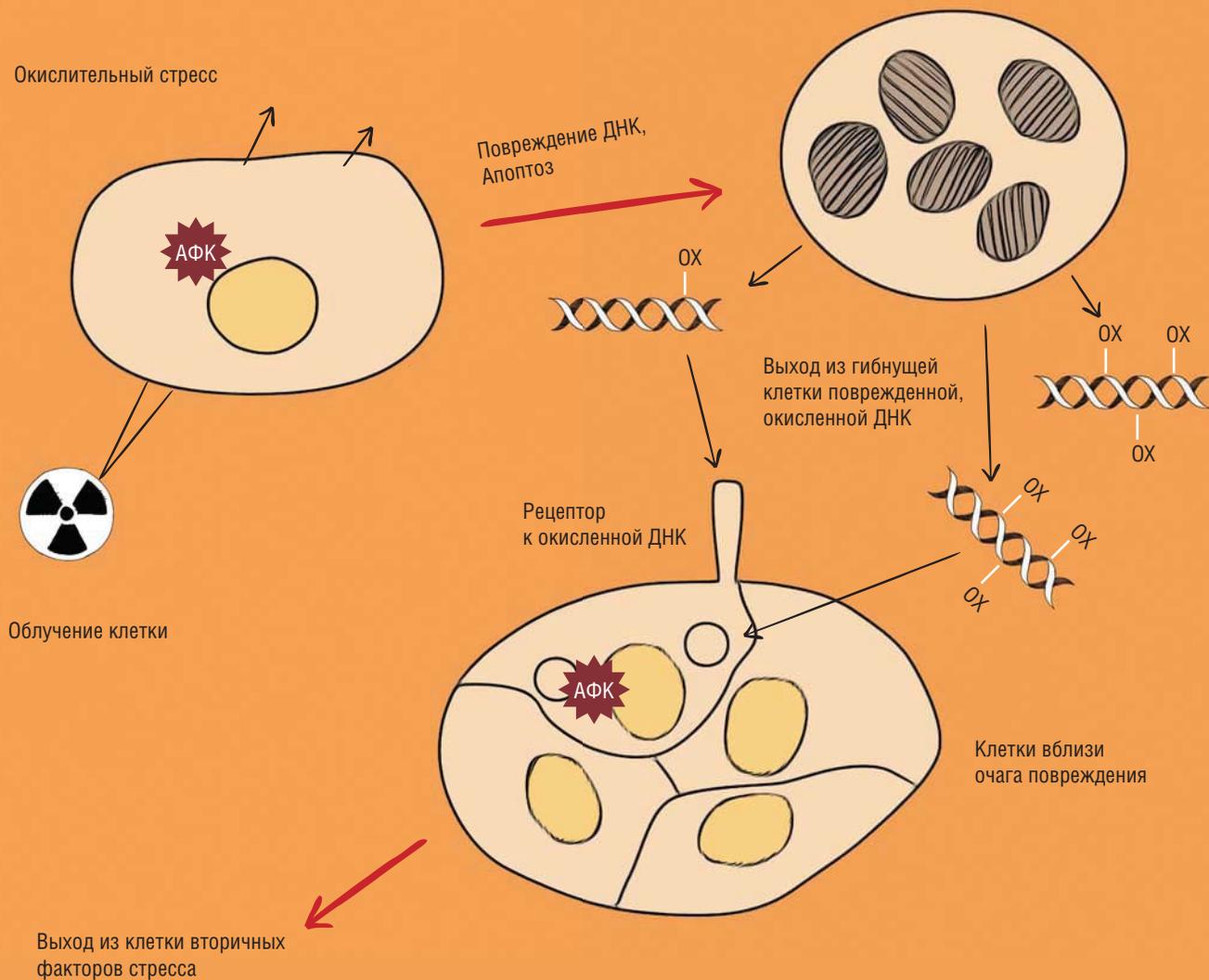
В исследованиях, проведенных автором в стенах Медико-генетического научного центра РАМН совместно с д. б. н. Н. Н. Вейко, был разработан способ оценки общего уровня стресса на основе степени окисленности внеклеточной ДНК, точнее, отношения количества нормального азотистого основания *гуанина* к поврежденному – *оксогуанину*. Этот маркер отражает уровень стресса, накопленного примерно за сутки. Нет большого смысла измерять стресс, накопившийся за месяц или три. А вот за сутки – это то, что надо.

Более того, оказалось, что выпущенная в кровь умирающими клетками окисленная ДНК, в свою очередь, является фактором стресса, «сообщая» другим клеткам организма о том, что где-то в недрах нашего тела не все в порядке. Получив эту информацию, даже клетки, удаленные от области повреждения, чувствуют себя неуютно и переходят в режим повышенной готовности к изменению их жизни не в лучшую сторону, т. е. подвергаются стрессу.

После этого совместно с компанией *Zansors* (США) мы придумали, что измерение уровня окисленной ДНК в крови можно выполнить электрохимическим методом. Когда ДНК контактирует с чувствительной матрицей своим гуанином или оксогуанином, возникает немного разный сигнал. Соотношение этих сигналов можно вычислить с помощью специального алгоритма и выразить в виде цифры. Это несложно: технически такая проблема уже решена, и с очень высокой точностью. Например, при работе секвенатора *Oxford Nanopore* через нанопору протягивается молекула ДНК, и в этот момент измеряется потенциал нуклеотида, он «прочитывается». У нас же более простая задача – посчитать общее количество «стандартной» и окисленной форм гуанина.

Вместе с *Zansors* мы планируем создать прибор, который будет выглядеть, как обычный браслет, но представлять собой биодатчик с микроиглочками, которые минимально инвазивно будут входить в контакт с межтканевой жидкостью. Такие микроиглочки также уже существуют, их производят несколько разных компаний. Мы предполагаем сделать так, чтобы на первом этапе датчик не выдавал численных данных, а только предупреждал об опасности. Если в организме что-то случилось, например микроинсульт, датчик выдаст сообщение, что надо срочно обратиться к врачу. Прибор следующего поколения будет выдавать число, суммирующее уровень стресса, полученного за день.

За такими биосенсорами – будущее, потому что они, наконец, позволят нам понимать, что именно мы с собой делаем каждый день. Например, один человек три раза



Концепция использования окисленной ДНК как основного кумулятивного маркера стресса.

Любое неблагоприятное воздействие (к примеру, ионизирующая радиация) повышает образование в клетке активных форм кислорода (АФК), вызывающих окислительное повреждение ДНК и способствующих гибели клетки в результате апоптоза – клеточного «самоубийства». Выходящие в окружающую среду из умирающей клетки окисленные молекулы ДНК взаимодействуют с соседними клетками, также вызывая в них повышенное формирование АФК и выделение воспалительных цитокинов, которые тоже являются факторами стресса

в неделю ходит в спортзал, а другой – нет, но раз в год он с друзьями играет в футбол. Он думает, что принесет себе пользу, побегав на свежем воздухе до упада, а на самом деле нерегулярные занятия физкультурой наносят организму большой вред. И если у него на руке будет наш датчик, после такой тренировки сигнал резко пойдет вверх, и человек поймет, что так больше делать не надо. Или полет на самолете – это стресс, но насколько? Сколько, к примеру, я нанесла себе вреда тем, что прилетела в Новосибирск?

Конечно, здесь все индивидуально. В соответствии с представлениями Г. Селье, стресс можно подразделить на «хороший» *эустресс* и «плохой» *дистресс*. Но как же нам понять, что мы попали уже в зону дистресса? Ведь не зря говорят, что две свадьбы по уровню стресса – как одни похороны, а два переезда – как один пожар. Именно поэтому такие датчики стресса надо носить постоянно, и если сигнал будет колебаться вокруг базовой линии, то все более-менее в порядке. Но если

датчик вдруг выдаст пик – это точно плохо, и надо срочно принимать меры.

Однако с распознаванием хронического стресса не все так просто. Базовая линия на датчике будет разной для разных людей: датчик на человеке, живущем в хроническом стрессе, не покажет явных пиков. Именно поэтому биодатчик стресса нужно носить с молодых лет пока у Вас нет особых стрессов. Тогда, в случае появления хронического стресса, его можно будет определить по повышению базовой линии.

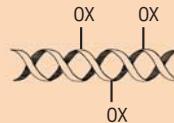
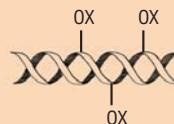
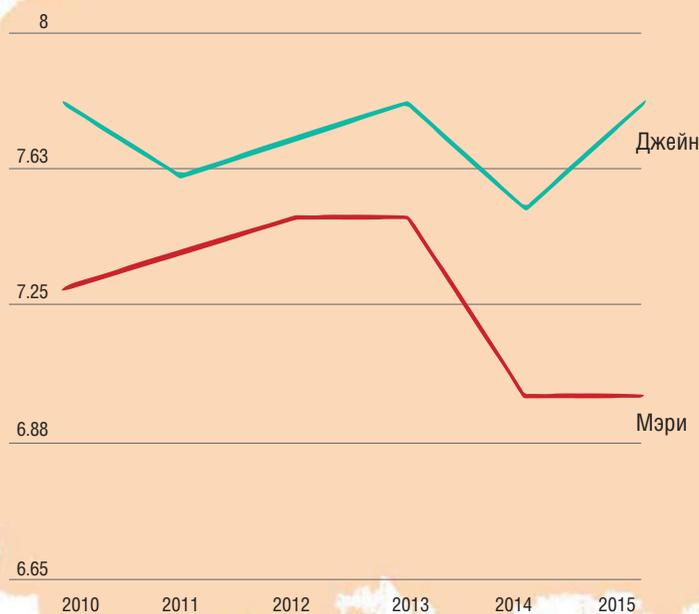
Чувствительные и устойчивые

Чувствительность к стрессу определяется генетически. Свой статус можно узнать, пройдя генетическое тестирование на присутствие или отсутствие некоторых генных вариантов, например, в компании «Атлас», которая проводит такое тестирование в России.

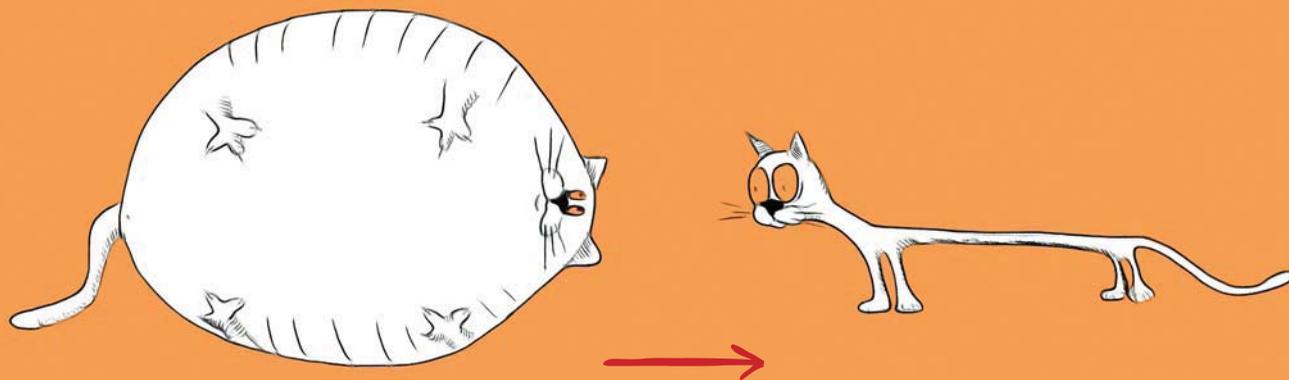
В качестве яркого примера значимости индивидуальной чувствительности к стрессу можно привести работу ученых В. И. Глазко и Т. Т. Глазко, возглавлявших генетическую программу по исследованию последствий

аварии на Чернобыльской АЭС для животных, обитавших в зоне заражения. В том числе они изучали коров, брошенных при эвакуации. На следующий год после аварии у коров родились вполне здоровые телята, но их было немного. В обычных условиях свободного выпаса корова рождает в среднем 0,9 теленка в год, а у чернобыльских буренок этот показатель был вчетверо ниже. Но во втором поколении, хотя радиация и не исчезла, рождаемость нормализовалась, произошла адаптация. Для первого же поколения коров появление радиации было сильным стрессом, который вызвал высокую смертность эмбрионов на этапе имплантации в стенку матки. И было показано, что при высоком радиационном стрессе погибли именно эмбрионы с генотипами, чувствительными к стрессу.

Описанная ситуация типична не только для всех крупных малоплодных животных, но и для людей. Например, если семейная пара переехала жить из деревни в город (это сильный стресс), то при попытке завести детей в матку женщины, возможно, будут имплантироваться только эмбрионы с устойчивым к стрессу генотипом, а неустойчивые подвергнутся



Пример измерения 8-оксогуанина, отражающего уровень стресса, в крови двух людей, Мэри и Джейн, в течение нескольких лет. Из графика видно, что Мэри смогла наладить свою жизнь, снизив уровень стресса, а вот Джейн это никак не удается. Такие измерения можно проводить как с помощью лабораторных методов (ELISA или масс-спектрометрия), так и с помощью биодатчиков. По оси Y – условные единицы



Высокое потребление энергии
Активный рост и развитие
Хорошо функционирующая
репродуктивная функция

Воздействие на
эндокринную
систему

Сокращение потребления энергии
Остановка роста и развития
Снижение репродуктивной функции
Высокая устойчивость к стрессу

Чувствительность или устойчивость к стрессу во многом определяются функционированием эндокринной системы. Так, в экспериментах на черве *C. elegans* подавление действия некоторых гормонов, в частности инсулина и гормона роста (с помощью создания генно-инженерных штаммов, например, без рецепторов к этим гормонам), повышает устойчивость к стрессу и может продлить продолжительность жизни червя в шесть раз

действию отбора, т.е. погибнут. Будущая «застрессованная» мама об этом даже не догадается, просто для наступления беременности ей потребуется не месяц-два, а четыре или пять.

Вполне возможно, что волнующие общество проблемы размножения у людей можно объяснить повышенным уровнем стресса. В нормальных природных условиях – вдали от дорог, при наличии сохранных мест обитания – животные размножаются без особых проблем. Даже у инбредных гепардов, происходящих из одной, очень маленькой популяции, которая обитает в Смитсоновском питомнике недалеко от Вашингтона, наблюдается стопроцентная фертильность после единичного полового акта. У человека же, несмотря на большое генетическое разнообразие, это далеко не так. Возможно, дело в том, что мы живем в *субоптимальных*, т.е. не вполне оптимальных условиях. Мы научились подавлять мысль, что уровень стресса, с которым мы сталкиваемся в повседневной жизни, весьма высок, но он все равно делает свое «черное» дело.

На протяжении большей части своей биологиче-

ской истории люди общались в основном в пределах собственной семьи, т.е. с очень ограниченным кругом других людей. Сейчас вокруг нас – толпы. А ведь человек каждый раз, когда видит другого человека, должен оценить, кто перед ним: друг, враг и т.п. Процесс принятия решения происходит непроизвольно, однако даже бессознательное принятие ежесекундных решений – это стресс. Это как в старом психологическом анекдоте, когда пациент жалуется доктору, что ненавидит работу, где он сортирует апельсины: большие, маленькие, средние... И, конечно, прежде всего при таком стрессе страдают чувствительные генотипы.

Биосенсоры – разнообразие идей

По поводу биосенсоров есть много интересных идей. Например, в компании *Zansors*, где я была научным консультантом, мы сделали и испытали прототип биосенсора на алкоголь. Он совсем не инвазивный – измерение степени опьянения происходит по поту –

и выглядит как нашлепка на груди. С точки зрения биологии и химии детекция алкоголя – очень простая вещь, и мы ничего принципиально нового не придумали, просто сделали приборчик, который можно использовать незаметно. Вот сидите вы в баре с девушкой и говорите: «Дорогая, мне пора подышать в трубочку, а то вдруг я упаду в лужу по дороге к тебе домой...» Как-то странно звучит, да? А вот если датчик, спрятанный под рубашкой, незаметно пошлет вам сигнал на айфон: «Дзынь», – пора остановиться, а то может случиться конфуз... Совсем другое дело!

В Америке можно выпить и потом сесть за руль. Хотя предел допустимой концентрации алкоголя в крови есть, но он гораздо менее жесткий, чем в России, и многие люди балансируют на этой грани. Но рисковать им не хочется, а высчитывать дозу бессмысленно, потому что не только у разных людей реакция организма на алкоголь разная, но даже у одного человека организм может повести себя необычно в ответ на «обычную» дозу, например, если он недавно перенес грипп. Биосенсор поможет это контролировать.

В России пить за рулем нельзя. Но можно сделать так, чтобы датчик при некотором пороге «принятого на грудь» подавал сигнал на сотовый. Человек сидит в баре, и ему приходит СМС-сообщение: «Дружок, тебе хватит». Или его жене: «Дорогая, забирай» – и координаты бара. Мы прототип такого датчика в Америке уже испытали на добровольцах, так сказать, в полевых условиях: на банкете, на конференции. Люди пили напитки, а мы записывали, что они пили, а потом снимали данные с датчика, приклеенного под рубашкой, и сопоставляли данные с дыхательным тестом. «Испытатели» от прибора были в восторге, единственная «просьба о доработке» поступила от чрезвычайно волосатого мужчины, который с большим трудом отклеил наш датчик от груди. Кстати, эта работа поддержана государством, которое очень хочет, чтобы люди контролировали, сколько именно они пьют, и ответственно относились к уровню алкоголя.

В той же компании разработали, и тоже на государственные деньги, прототип прибора, который с помощью тест-полосок измеряет в воде концентрацию ионов железа, свинца и ртути. Человек может измерить, сколько свинца, например, в воде из крана в его доме, а после этого данные с координатами места по Wi-Fi автоматически посылаются в «облако». Допустим, людей с такими приборчиками много, и каждый измерил свинец, скажем, у себя на дачном участке и у своих друзей. А государство в масштабах страны получило карту районов, где превышена ПДК по свинцу.

Несколько лет назад был скандал в американском городке Флинт Хилл, где когда-то, «на заре цивилизации»,

муниципалитет установил свинцовые трубы. Потом трубы заменили, но старые остались лежать в земле, про них забыли. Когда новые трубы начали подтекать, в них стал просачиваться свинец. В районе начались странные проблемы со здоровьем, например, с интеллектуальным развитием у детей. Причину нашли далеко не сразу, и много людей пострадало. При наличии подобных датчиков причину нашли бы гораздо быстрее.

Мы хотим развить эту технологию, чтобы можно было детектировать с помощью тест-полосок наличие ртути в морской рыбе, в которой ее бывает слишком много. Но ртуть в рыбе находится не в виде ионов, а в виде ртутьорганических соединений, и сделать простой тест на эти соединения сложно. Однако у меня имеется на этот счет пара идей.

Есть биосенсоры, которые применяют спортсмены, чтобы тренироваться оптимально. Например, уже выпускается измеряющий усталость мышц датчик *молочной кислоты (лактата)* для велосипедистов. Но ведь можно измерить и другие важные для спортсменов вещи, например, уровень электролитов в крови, глюкозы, да и просто гидратации...

Возвращаясь к стрессу, скажем несколько слов о борьбе с ним. Ходить за рекомендациями по борьбе со стрессом к врачу практически бесполезно. Вы либо услышите общую рекомендацию типа «попытайтесь не спорить с мамой и вообще не нервничать», либо получите рецепт на успокоительные таблетки. Но пить таблетки, которые влияют на работу мозга, с моей точки зрения, не очень хорошая идея, за исключением случаев серьезной патологии вроде шизофрении. С другими, более «мягкими» состояниями лучше справляться немедикаментозными способами, например, снижать общую выраженность патофизиологических процессов в организме. Немедикаментозные стратегии снижения уровня стресса существуют. На самом деле, их принципы давно известны. Самая простая и универсальная стратегия – сон, во сне человек восстанавливается. После сильного стресса поспать часиков десять – отличная с точки зрения физиологии идея. Однако мы обычно чувствуем себя виноватыми, что проспали лишние два-три часа, и зря.

Можно принимать и антистрессовые биодобавки. Но тут есть нюанс. Биодобавки практически не стандартизируются. Не в том смысле, что их применение антинаучно, наоборот, для большинства биодобавок есть целая куча научных данных, описывающих эффекты этих природных соединений. Однако одну и ту же биодобавку может выпускать десяток разных фирм, да и у конкретной компании сырье для производства может поступать то из одной страны, то из другой.

Нередки случаи, когда выяснялось, что какое-то растение было собрано в Китае вблизи автомагистрали. Это означает, что вместе с полезным антиоксидантом вы имеете шанс заодно подзарядиться и опасной дозой свинца, которая сведет на нет всю пользу от недешевого БАДа. Пока, к сожалению, у покупателя нет никаких способов оценить качество биодобавки, содержащейся в конкретной баночке, кроме органолептических показателей (цвет, запах, консистенция,), а также такого весьма ненадежного показателя, как «общее самочувствие»...

Если будет создан датчик, измеряющий стресс, то, начав принимать какой-либо препарат, можно будет увидеть, что человеку помогает, а что – нет. Возможно, что-то наоборот вредит, к примеру, если при экстрагировании полезного вещества применялась хроматографическая очистка с использованием органических растворителей, которые сами – источник стресса.

Вероятно, тут есть возможности для создания огромного рынка по тестированию биодобавок. Можно организовать целую новую отрасль, занимающуюся стандартизацией относительной активности природных веществ, находящихся вне поля лекарственных средств, по суррогатному маркеру – по уровню окислительного стресса. Проводить клинические испытания не по симптомам болезней, а по биомаркерам гораздо проще и дешевле. И это даст хоть какую-то стандартизацию для так популярных в народе биоактивных препаратов.

Помните: у стресса нет единой причины. Просто мы, люди, тесно взаимодействуем с окружающей средой

и друг с другом, поэтому стресс неизбежен. Универсального решения проблемы стресса просто нет. Но надо стараться справляться с ним, используя для этого все возможности.

Литература

Ermakov A. V., Konkova M. S., Kostyuk S. V. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells // Oxid Med Cell Longev. doi: 10.1155/2013/649747.

Gassman N. R. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects // Environ Mol Mutagen. 2017. V. 58. N. 2. P. 60–71.

Gems D., Partridge L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts // Annu Rev Physiol. 2013. N. 75. P. 621–644.

Glebova K., Veiko N., Kostyuk S. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy // Cancer Lett. 2015. V. 356. N. 1. P. 22–33.

Li-Pook-Than J., Snyder M. iPOP goes the world: integrated personalized Omics profiling and the road toward improved health care // Chem Biol. 2013. V. 20. N. 5. P. 660–666.

Mertz L. Convergence Revolution Comes to Wearables: Multiple Advances are Taking Biosensor Networks to the Next Level in Health Care // IEEE Pulse. 2016. V. 7. N. 1. P. 13–17.

Wright S. P., Hall Brown T. S., Collier S. R. et al. Sandberg K. How consumer physical activity monitors could transform human physiology research // Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2017. V. 312. N. 3. P. 358–367.





Мобильный аналитик здоровья Welltory — всегда под рукой!





Основатели *Welltory Inc.*: IT-эксперт, предприниматель Павел Правдин и стартап-евангелист Евгения Смородникова – руководители *Founder Institute* (Санкт-Петербург), сооснователи стартап-студии *Coffee Lab. vc.*; Александр Лысковский – предприниматель, основатель игрового издательства *Alawar*, эксперт по казуальным и мобильным играм, геймификации

Управлять стрессом и восполнять запасы энергии в организме с помощью смартфона – такое стало возможно с появлением мобильного приложения Welltory. Этот плод продвинутых методов медицинской диагностики и IT-технологий сегодня собирает и анализирует данные о состоянии организма и предлагает конкретному пользователю стратегию и тактику поддержания здоровья, а скоро научится и оценивать риск развития заболеваний

Ключевые слова: здоровье, персонализированная медицина, мобильные приложения, гаджеты, здоровый образ жизни, управление стрессом, энергия, IT-технологии, переменчивость сердечного ритма (BCP), профессиональное выгорание.
Key words personalized medicine, health, healthy lifestyle, gadgets, stress management, energy, IT-technologies, occupational burnout, heart rate variability (HRV)

Все мы хотим быть и долгие годы оставаться здоровыми. Добиться желаемого результата позволяет ежедневный мониторинг состояния организма и постоянные индивидуальные консультации по ведению правильного образа жизни. Но, к сожалению, обычные врачи не могут уделять столько времени здоровым людям, а последние по большей части не готовы платить деньги за медицинскую помощь подобного рода. Поэтому наша команда, многие участники которой занимались собственным IT-бизнесом и в свое время сами столкнулись с проблемой хронической усталости и профессионального выгорания, создала мобильное приложение *Welltory*.

Врач-консультант в вашем смартфоне

Проект с самого начала задумывался как серьезное медицинское приложение с крепкой научной базой, широким функционалом, применением *геймификации*, т.е. с использованием лучших технологий игровой индустрии. Нашей главной задачей было собрать в одной команде не только серьезных программистов и айтишников, но и ученых и медиков. Это было достаточно сложно, если учесть, что эти люди редко пересекаются в своей профессиональной деятельности и говорят практически на разных языках.

Сейчас *Welltory* – это обученная нейронная сеть, которая самостоятельно ищет корреляции между различными морфофункциональными параметрами организма и выдает пользователю рекомендации по здоровому образу жизни. Но сначала эти причинно-следственные связи устанавливали, конечно, специалисты, и они же общались и с первыми пользователями. В проект



Образ жизни:

- Сон
- Питание
- Физическая активность
- Режим труда и отдыха

Наше здоровье и самочувствие на 70% находятся в наших собственных руках

В США до 70% всех визитов к врачу вызваны симптомами, к которым приводит сильный стресс. По оценкам, примерно такая же часть взрослого населения живет в постоянном стрессе и в России. Но если в нашей стране мало кто обращается в больницу с жалобами на постоянную усталость и раздражительность, периодическую бессонницу и головную боль, то большинство американцев, ведущих здоровый образ жизни, делают это по рекомендации страховой компании или семейного врача. Ежедневные пробежки, йога – такие советы часто носят не рекомендательный, а обязательный характер, и если сотрудник американской фирмы не будет выполнять подобные предписания, у него могут отобрать медицинскую страховку. Американцы хорошо знакомы с термином *energymanagement* и понимают, что профессиональное выгорание – это не блажь, а симптом, который приводит к серьезным патологиям

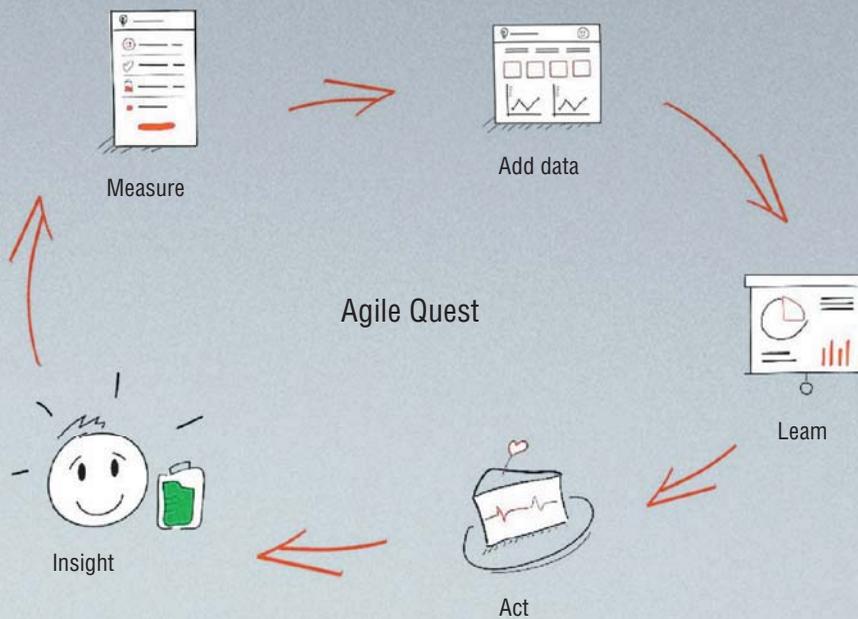
были вовлечены десятки исследователей из различных областей медицины и практикующих врачей со всей России: сомнологи, неврологи, терапевты, диетологи, фитнес-тренеры и др. Наши пользователи могут быть уверены: любая рекомендация от *Welltory* в их мобильном – это рекомендация врача.

Как это работает? Во-первых, программа собирает полный «анамнез» жизни пользователя, ежедневно самостоятельно фиксирующего в личном кабинете так называемые «дата-поинты» (*date point*) – данные, касающиеся событий его жизни: как спал, что ел, как добирался до работы, сколько времени провел на встречах и за компьютером, был ли в спортзале, когда лег спать и т. п., и как при этом себя чувствовал. Приложение анализирует все эти факты, чтобы найти влияние каждого из них на самочувствие.

Состояние здоровья объективно оценивается по уровням стресса и адаптационного ресурса (попросту – запаса энергии). Для такой оценки в *Welltory* используется измерение состояния вегетативной нервной системы на основе анализа вариабельности сердечного ритма. Подобная технология используется неврологами и кардиологами во всем мире, она признана в профессиональном спорте и спецслужбах. Нашей команде удалось оптимизировать этот метод для повседневного применения.

В итоге *Welltory* предлагает пользователю способы улучшить свое самочувствие и пути решения возникших проблем, связанных с недосыпанием, вялостью, низкой продуктивностью и слабым тонусом, головными болями, нервным напряжением.



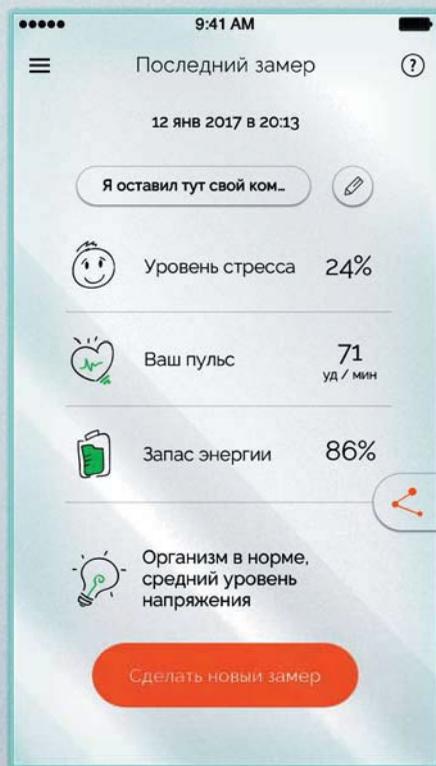


С мобильным приложением *Welltory* вы получаете личного врача, который будет давать вам индивидуальную консультацию по поддержанию здоровья до того, как вы действительно заболите. Главная проблема здорового человека в России в том, что ему приходится самому разбираться в первых симптомах нездоровья или продолжать жить в постоянном стрессе

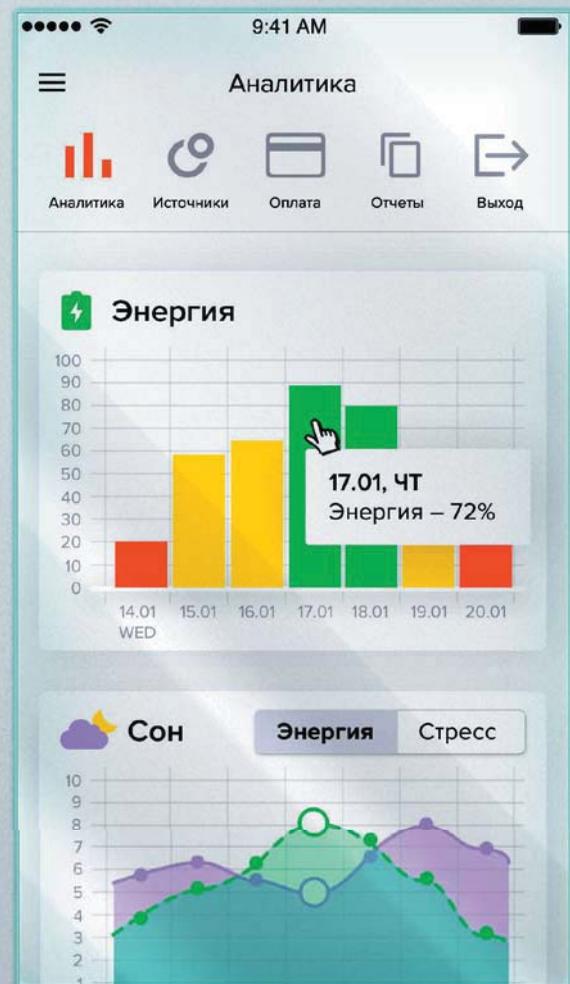
Welltory – это обученная нейронная сеть, которая самостоятельно ищет корреляции и выдает пользователю научно обоснованные рекомендации по здоровому образу жизни

Падает атмосферное давление – время пить кофе

Welltory, давая инструмент измерения объективных показателей стресса и энергии, предоставляет людям возможность увидеть, как эти факторы и образ жизни влияют на их рабочую продуктивность и настроение. Приложение может собирать данные



Интерфейс мобильного приложения *Welltory*





А КАКОЙ ПОТЕНЦИАЛ У ВАС?

Формулу адаптационного потенциала впервые использовал один из основоположников космической кардиологии доктор медицинских наук Р. М. Баевский, который принимал непосредственное участие в подготовке и медицинском обеспечении первых космических полетов животных и человека. На базе этого опыта он разработал принципиально новый подход к оценке уровня здоровья: «донозологическую диагностику», исследующую состояния, пограничные между нормой и патологией. Сегодня Р. М. Баевский является участником проекта Welltory.

Адаптационный потенциал системы кровообращения, который используется в медицинской практике, рассчитывается без проведения нагрузочных тестов на основе замеров частоты сердечных сокращений в относительном покое, а также показателей артериального давления, массы тела, роста, возраста и дает предварительную количественную оценку уровня здоровья обследуемых (Баевский, 1979).

Для оценки адаптационных возможностей организма человека особый интерес представляют данные о колебаниях характеристик сердечного ритма, которые служат своеобразным индикатором функционального состояния регуляторных систем. С этой целью определяется выраженность колебаний частоты сердечных сокращений по отношению к ее среднему уровню. В настоящее время такой подход признан наиболее информативным неинвазивным методом количественной оценки вегетативной регуляции сердечного ритма и функционального состояния организма (Казин и др., 2000)

Мобильное приложение Welltory уже скачали 150 тыс. пользователей, которые сделали более 1 млн замеров variability сердечного ритма. В базе собрано 480 млн «дата-пойнтов» об образе жизни



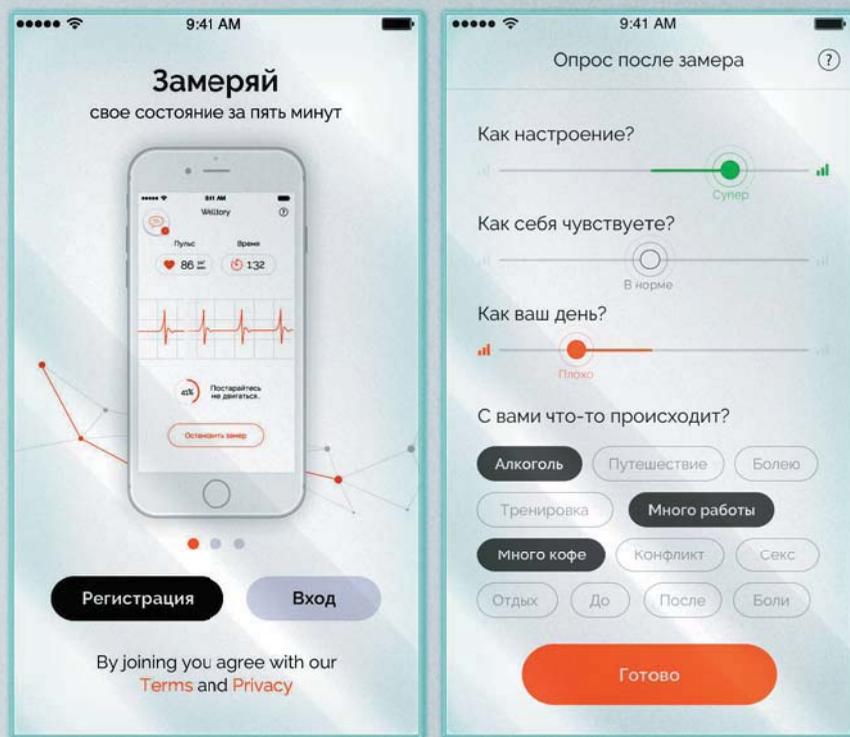
Оценка уровня стресса и адаптивных резервов («энергии») по частоте сердечного ритма проводится с помощью камеры смартфона за 3—4 минуты. Для этого нужно приложить один палец к камере смартфона, а другой – к вспышке. Камера измеряет количество красного света, отраженного ногтевой пластиной (точнее, кровеносными сосудами под ней), и рассчитывает пульсовую волну, на основе чего замеряется период времени между ударами сердца



практически со всех фитнес-гаджетов, смарт-часов и других приложений, что позволяет получать самую разную информацию, касающуюся сна, питания, уровня атмосферного давления, физической активности и даже работы за компьютером.

Вся эта информация не просто хранится в облаке: программа ее анализирует и дает человеку объективное представление о состоянии его здоровья, а также отвечает на насущные вопросы, возникающие перед конкретным пользователем. Например, сколько мне нужно спать, чтобы успеть восстановиться? Помогают ли бег и прогулки снижать уровень стресса? Является ли просмотр сериалов настоящим отдыхом? Какой вид спорта мне больше подходит? Как действует на организм вегетарианская диета? Увеличивает ли стресс потребление пищи? Есть ли у меня метеозависимость?

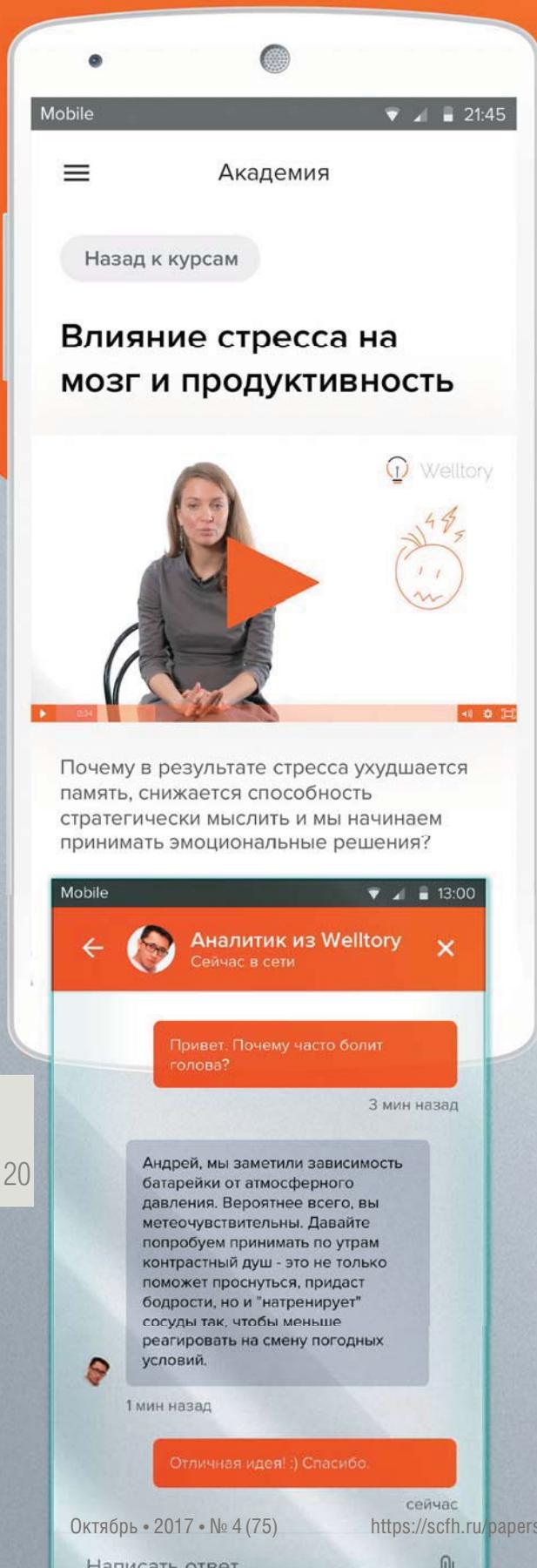
Так, оказалось, что четверть всех пользователей *Welltory* – это метеозависимые люди. И хотя эта патология считается не очень серьезной, она, тем не менее, создает дискомфорт. Обнаружив взаимосвязь



«Дата-поинты», такие как отметки «Алкоголь», «Много кофе», «Тренировка», помогают программе оценить физическое и психическое состояние пользователя и найти корреляции между событиями дня

между атмосферным давлением и состоянием вашего здоровья, аналитик *Welltory* при смене погоды предупредит о возможных головных болях и посоветует исключить избыточные физические нагрузки.

Если человек ежедневно просыпается утром усталым, то программа будет искать корреляции между этим состоянием и временем засыпания, температурой в комнате (если есть датчик), глубиной фазы сна непосредственно перед пробуждением по звонку будильника. И если такие взаимосвязи будут обнаружены, то для начала пользователь получит совет проветривать комнату перед сном или установить «умный» будильник, определяющий



В 2017 г. команда разработчиков *Welltory* начала сотрудничать с учеными Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), и, возможно, в будущем партнерство ученых-медиков и программистов принесет свои плоды. Например, уже сейчас в институте испытывают прототипы бесконтактных кардиомониторов. В случае успеха появится компактный кардиомонитор, который можно будет носить в кармане рубашки, и программное обеспечение, которое будет обрабатывать информацию о состоянии сердечно-сосудистой системы и отправлять ее на мобильный телефон пользователя или его лечащего врача

фазы сна по телодвижениям и включающий сигнал будильника, когда пользователь находится в быстрой фазе сна. Если после следования им уровень стресса понизится и человек будет себя чувствовать лучше – значит рекомендации помогли и их можно придерживаться в дальнейшем.

Пользователь *Welltory* имеет возможность не только получить советы по поддержанию здоровья, но и расширить свои знания, познакомившись с основами физиологии спорта, работы мозга, здорового питания и т. п. Это проект многослойный: образовательная его часть так и называется – «Академия *Welltory*». Для каждой темы о здоровье и используемых методах имеются специально подобранные ссылки на научные статьи в *PubMed*, а также оригинальный контент, в том числе видеолекции. Такие возможности есть как в бесплатной версии приложения, так и в расширенном варианте на платных тарифах.

Универсальных рекомендаций по ведению здорового образа жизни по понятным причинам не существует. Поэтому большинство мобильных приложений на эту тему ограничиваются общими рекомендациями по поддержанию здорового образа жизни без учета особенностей организма конкретного человека. Есть приложения, которые оценивают уровень стресса, но не предлагают никаких решений для исправления ситуации, а просто ставят пользователя перед фактом.

Уникальность приложения *Welltory* состоит не в использовании каких-то суперновых цифровых технологий: метод оценки уровня стресса по изменчивости сердечного ритма, как уже упоминалось, общеизвестен. В *Welltory* удалось собрать все имеющиеся возможности воедино благодаря сотрудничеству серьезных программистов с учеными и врачами. Кроме того, благодаря игровым элементам пользователь как будто проходит квест из заданий, итогом которого становится нормализация состояния организма.



Осенью 2017 г. приложение начнет сообщать о риске развития простудного заболевания. Делать подобные предсказания не так уж и сложно. Как правило, перед возникновением болезни пользователь отмечает такие события, как недостаток сна, интенсивную трату энергии без восполнения ее запасов, резкую смену климата – все это провоцирует рост уровня стресса, на фоне чего происходит падение иммунитета. Сейчас операторы приложения предупреждают об этом лично в чате, но уже осенью это будет делаться автоматически в программе.

Глобальная задача разработчиков – набрать такой объем информации, который позволит научиться отслеживать состояния организма, предшествующие возникновению серьезных заболеваний, таких как инсульт и инфаркт. И тогда мы сможем говорить уже о профилактике патологических состояний, т. е. о настоящей персонализированной медицине.

Литература

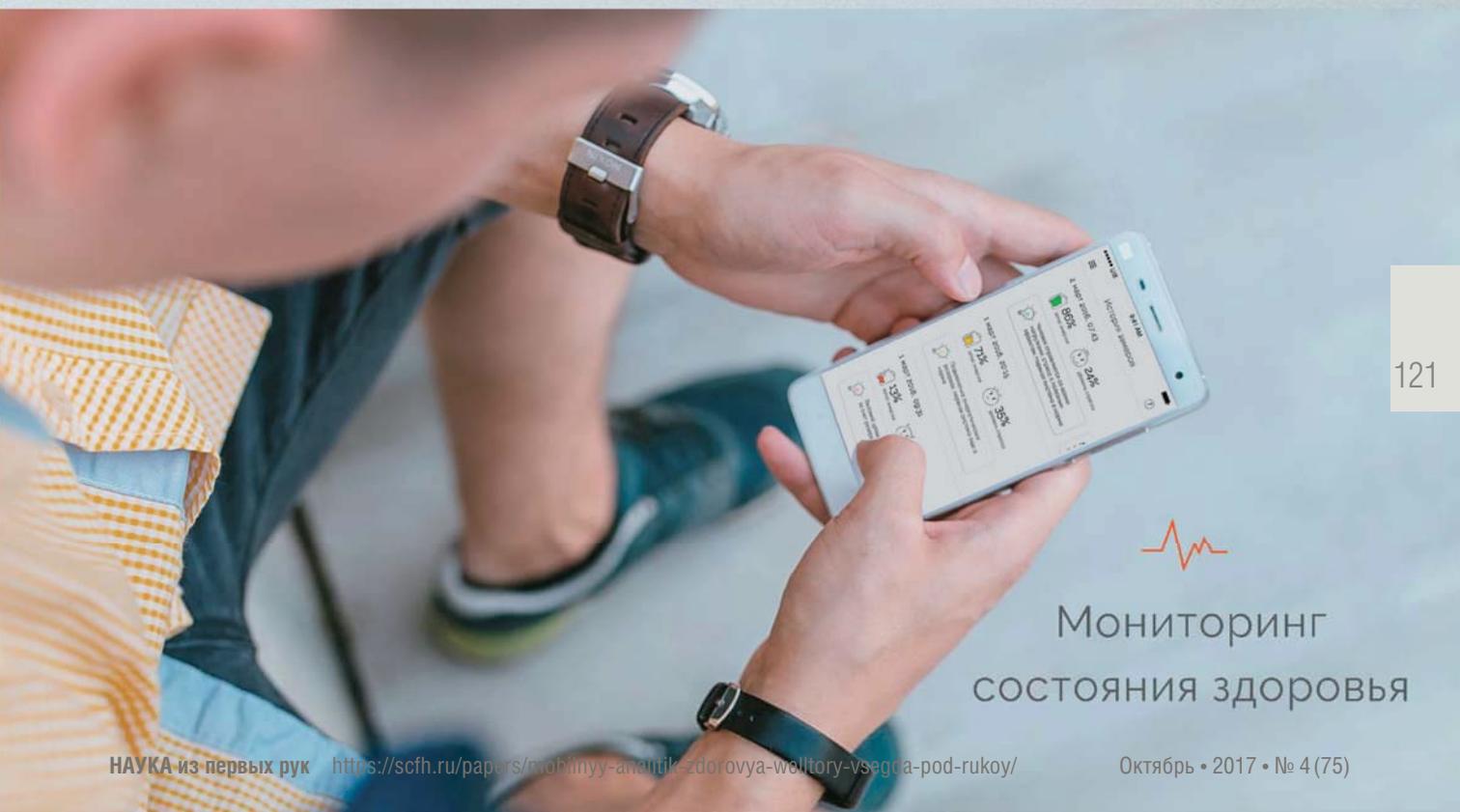
Buccelletti E., Gilardi E., Scaini E. et al. Heart rate variability and myocardial infarction (heart attack): systematic literature review and metaanalysis // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2009. V. 13. N. 4. P. 299–307.

Koskinen P., Virolainen J., Kupari M. Acute(sudden or temporary) alcohol intake decreases short-term heart rate variability in healthy subjects // *Clin Sci (Lond)*. 1994. V. 87. N. 2. P. 225–230.

Lenskiy A., Aitzhan Ye. Extracting Heart Rate Variability from a Smartphone Camera // *J. Inf. Commun. Converg. Eng*. 2013. V. 11. N. 3. P. 216–222.

Schneiderman N., Ironson G., Siegel S.D. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants // *Annual Review of Clinical Psychology*. 2005. N. 1. P. 607–628.

Thayer J.F., Yamamoto S.S., Brosschot J.F. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease (heart disease) risk factors // *Int J Cardiol*. 2010. V. 141. N. 2. P. 122–131.





ЭКЗОСОМЫ — МЕЖКЛЕТОЧНАЯ ПОЧТА



Давно известно, что клетки «общаются» друг с другом посредством сигнальных молекул, которые они выделяют в межклеточную жидкость. Но открытия последних лет радикально изменили взгляды на механизмы этого взаимодействия. Выяснилось, что, помимо сигнальных молекул, клетки секретируют везикулярные (пузырьковые) структуры, которые могут перемещаться по организму и избирательно проникать в другие клетки, доставляя в них белки и нуклеиновые кислоты и таким образом влияя на их жизнедеятельность

Ключевые слова: экзосомы, внеклеточные везикулы, адресная доставка, медицинская диагностика, терапия рака.
Key words: exosomes, extracellular vesicles, targeted delivery, medical diagnostics, loading, cancer therapy

© А. И. Неуместова, А. Л. Алексеева, М. А. Зенкова, 2017



НЕУМЕСТОВА Александра Ильинична – аспирантка, сотрудница лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)



АЛЕКСЕЕВА Анастасия Леонидовна – аспирантка, сотрудница лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), Автор и соавтор 4 научных работ



ЗЕНКОВА Марина Аркадьевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 252 научных работ и 18 патентов

Нельзя сказать, что до открытия «путешествующих» пузырьков-везикул биологи совсем не подозревали о том, что клетки секретируют подобные структуры, как и о возможности межклеточного переноса нуклеиновых кислот. Так, было известно, что при содержании в культуре клетки выделяют в среду ДНК и РНК, а в крови животных обнаруживали циркулирующие внеклеточные молекулы нуклеиновых кислот. Однако секретируемым клетками везикулярным структурам приписывалась роль «мусорщиков», убирающих из клетки ненужные вещества, а появление в кровотоке нуклеиновых кислот зачастую объясняли их поступлением из погибших клеток. При этом не предпринималось никаких попыток установить, в составе каких структур секретируются из клеток эти макромолекулы.

Все изменилось в 2007 г., когда было обнаружено, что крошечные внеклеточные пузырьки, которые выделяют клетки, несут в себе функционально активные генетические программы (Valadi, 2007). Начались активные исследования структуры везикул, механизма их биогенеза и биологической активности. Оказалось, что эти внеклеточные образования являются не «мусорщиками», а транспортерами биологических макромолекул, среди которых – короткие *регуляторные РНК* (микро- и другие некодирующие РНК) и даже кодиру-

ющие *матричные РНК* (мРНК). С помощью мРНК эти «посланники» могут побуждать клетки-реципиенты синтезировать белки, которые до этого в них не присутствовали.

В исследованиях везикулярных структур включились ведущие биологические и биомедицинские лаборатории. В 2011 г. в Гетеборге (Швеция) было основано Международное общество по внеклеточным везикулам, а уже на следующий год состоялась первая конференция, посвященная исключительно этой области исследований. Тогда же был основан и журнал *Journal of Extracellular Vesicles*. С тех пор Общество проводит ежегодные симпозиумы, школы и конференции.

Какими они бывают

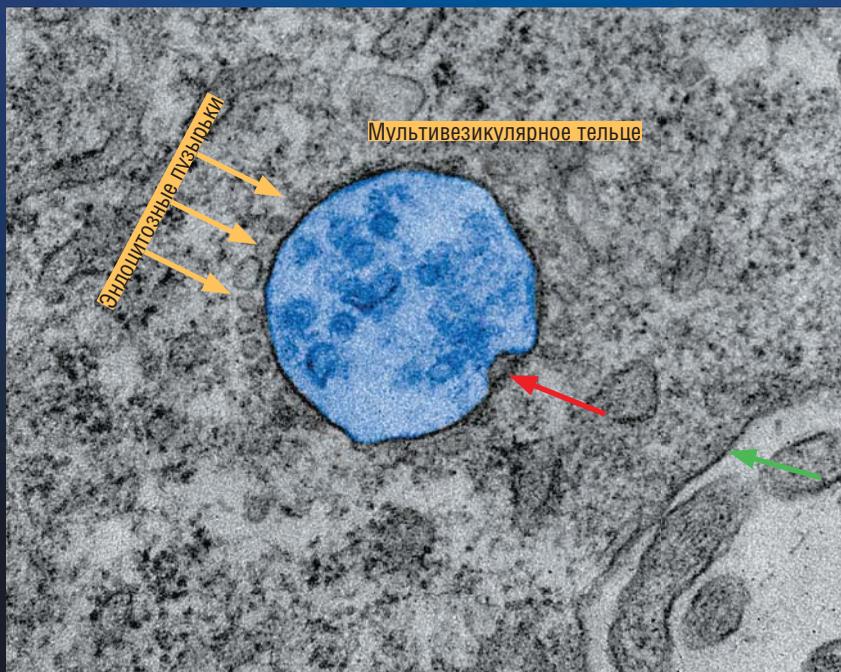
Внеклеточные везикулы представляют собой сферические структуры размером от 40 до нескольких сотен и даже тысяч нанометров. Их подразделяют на разные типы в зависимости от размеров, состава и способа образования.

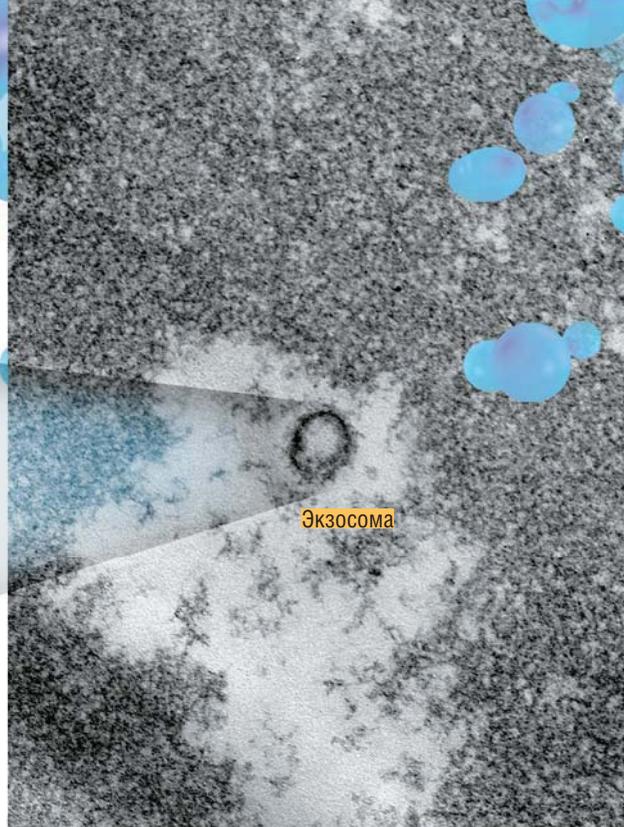
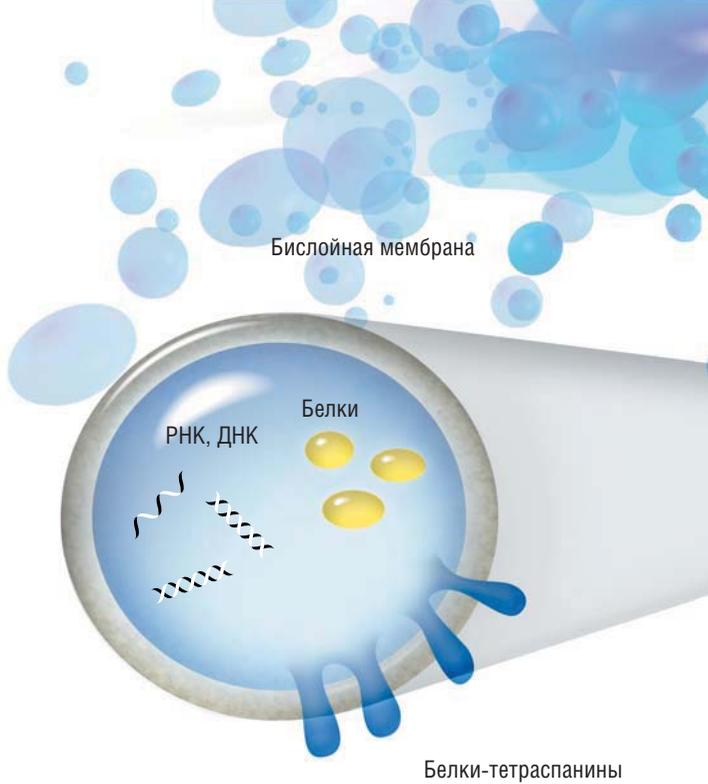
Самый большой (до 5000 нм) размер среди внеклеточных везикул имеют *апоптотические тельца*, которые представляют собой фрагменты клеток, разрушившихся в результате *апоптоза* – процесса запрограммированной клеточной гибели. Ученые «доэксосомной» эпохи



Существует несколько типов внеклеточных пузырьков-везикул: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Апоптотические тельца представляют собой «останки» клеток, погибших в результате апоптоза («клеточного самоубийства»). Микровезикулы образуются путем выпячивания участка плазматической мембраны и отпочкования его в окружающую среду. Экзосомы формируются в мембранных клеточных органеллах, связанных с транспортом веществ внутри клетки. Сначала образуется мультивезикулярное тельце, содержащее мембранные пузырьки, которое затем сливается с клеточной мембраной и выбрасывает экзосомы во внеклеточную среду

Процесс формирования экзосом в клетке культуры MDA-MB (опухоль молочной железы, *внизу*) начинается с транспорта эндоцитозных пузырьков в позднюю эндосому (мультивезикулярное тельце), которые сливаются с ее мембраной (*красная стрелка*). Пузырьки, располагающиеся в просвете тельца, могут стать экзосомами, если тельце сольется с плазматической мембраной (*зеленая стрелка*). Ультратонкий срез, просвечивающая электронная микроскопия. Препарат Б. Челобанова, фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН)





Экзосомы обычно выделяют из биоматериала – культуральной среды (если речь идет о культурах клеток) или биологических жидкостей, таких как кровь, моча, слюна. Классический способ выделения путем последовательного центрифугирования – процесс длительный и трудоемкий. Для практического применения обычно используют гель-фильтрацию, которая позволяет разделять частицы на основании их размера. Этот способ обеспечивает получение достаточно чистых препаратов, однако также занимает много времени, что ограничивает его использование в широких масштабах. Для выделения фракций микровезикул, несущих определенные белки, используют аффинные методы выделения (с помощью антител к нужным белкам)

часто предполагали именно этот вариант, когда находили в кровотоке нуклеиновые кислоты. *Микровезикулы*, размер которых может достигать 1000 нм, образуются путем отпочковывания в окружающую среду участка плазматической мембраны клетки.

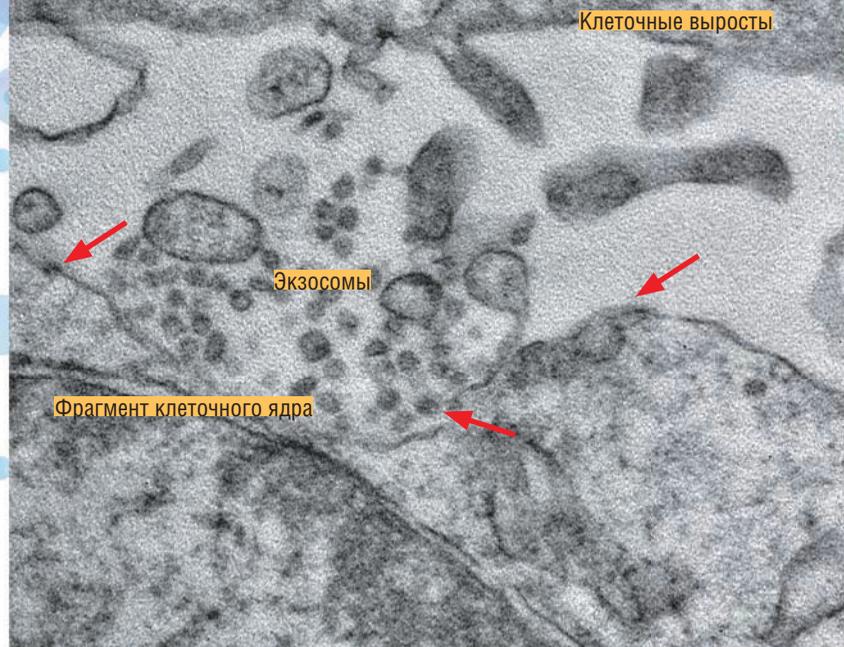
Но наибольшее внимание научного мира сейчас приковано к *экзосомам*. Эти везикулы, имеющие размер от 40 до 100–150 нм, образуются в *эндосомах* – мембранных внутриклеточных органеллах, связанных с транспортом вещества внутри клетки. Экзосомы формируются путем «впячивания» участка эндосомальной мембраны в просвет органеллы, который затем отшнуровывается. Эндосома, содержащая экзосомы, называется уже *мультивезикулярным тельцем*. Эта клеточная структура либо уничтожается протеолитическими ферментами, либо направляется к мембране клетки, где сливается с ней и «раскрывается», выбрасывая свое содержимое во внеклеточную среду.

Все экзосомы устроены схожим образом. В зависимости от вида клеток и условий их культивирования эти структуры несут различные наборы РНК, белков и ДНК, а их мембрану пронизывают белки-тетраспаныны, которые служат маркерами экзосом. *Справа – экзосомы из крови человека. Ультратонкий срез, просвечивающая электронная микроскопия. Препарат Б. Челобанова, фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН)*

Везикулярные структуры могут секретировать самые разные клетки. В зависимости от вида клеток и условий культивирования они несут разные наборы РНК и белков, а также могут содержать ДНК. Например, было показано, что экзосомы клеток разных видов рака могут переносить двуцепочечную ДНК, в которой присутствуют те же мутации, что и в ДНК родительской раковой клетки (Thakur *et al.*, 2014).

«Длинные руки» клеток

Сегодня не вызывает сомнений, что экзосомы участвуют во многих процессах в организме. С ними, к примеру, связывают терапевтические эффекты *стволовых клеток* – недифференцированных («незрелых») клеток, из которых формируются специализированные клетки и ткани.



Выделение экзосом из клетки культуры MDA-MB (опухоль молочной железы). Мультивезикулярное тельце слилось с плазматической мембраной (красные стрелки), и пузырьки-экзосомы вышли во внеклеточное пространство.

Ультратонкий срез, просвечивающая электронная микроскопия. Препарат Б. Челобанова, фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН)

Стволовые клетки уже давно пытаются применять в медицине, и не без успеха. Так, имеются положительные результаты экспериментов по восстановлению повреждений печени, почек, легких, кожи и даже сердечной мышцы после инфаркта с помощью инъекций стволовых клеток. Есть предположение, что такое регенеративное действие оказывают не сами клетки, а секретируемые ими продукты, в том числе микровезикулы, которые переносят специфические наборы матричных и малых интерферирующих РНК (Rani, 2015).

Экзосомы, выделяемые антигенпрезентирующими дендритными клетками, играют важную роль в развитии иммунного ответа. Эти клетки захватывают антигены – чужеродные молекулы и представляют их другим клеткам иммунной системы – Т-лимфоцитам, участвующим в дальнейших иммунных реакциях организма. Экзосомы, как и их клетки-прародительницы, также имеют встроенный в мембрану молекулярный главный комплекс гистосовместимости, в составе которого антигены «представляются» иммунным клеткам организма.

Экзосомы вовлекаются и в развитие вирусных инфекций. Так, клетки, зараженные ВИЧ, могут с помощью экзосом распространять по организму вирусные белки и РНК, таким образом способствуя ослаблению иммунной системы и развитию инфекции (Madison, 2015; Teou, 2016).

Много экзосом выделяют и клетки злокачественных опухолей. Дело в том, что наибольшее число экзосом продуцируется при пониженной концентрации кислорода (гипоксии), а такое состояние характерно для опухоли. Экзосомы содействуют развитию и распространению рака в организме,

увеличивая проницаемость сосудов и подготавливая почву для успешного метастазирования.

Так, в случае глиобластомы, одной из самых распространенных и агрессивных опухолей мозга, экзосомы ускоряют рост раковых клеток и способны вызывать злокачественную трансформацию нормальных клеток. Экзосомы заметно влияют на микроокружение опухолевых клеток, меняя состав поверхностных белков клеток *нейроглии* – вспомогательного «персонала» мозговой ткани и уровень секреции *цитокинов* (небольших гормоноподобных пептидных молекул), снижая тем самым способность макрофагов захватывать опасные объекты. В клетках *микроглии* (вспомогательных иммунных клетках центральной нервной системы) экзосомы провоцируют накопление белка *матричной металлопротеиназы*, характерного для клеток опухоли и стимулирующего развитие метастазов и *ангиогенез* (разрастание сосудов) (Gourlay, 2016).

Одно из свойств глиобластомы, способствующих ее быстрому распространению, – образование *инвадоподий*. Эти выросты клеточной мембраны, богатые сократительным белком актином, могут разрушать внеклеточные тканевые структуры благодаря действию ферментов протеаз, расщепляющих белки. Оказалось, что рост и регуляция инвадоподий также могут быть опосредованы экзосомами (Hoshino, 2013).

Перспективы в диагностике и терапии

Исследования экзосом уже привели к получению практических результатов, и в первую очередь в диагностике: при ряде заболеваний из биологических жидкостей человека можно выделить экзосомы, несущие маркеры – определенные РНК

Можно простимулировать культивируемые клетки выделять много экзосом, например, создавая им стрессовые условия. Для этого можно уменьшить в среде концентрацию глюкозы, изменить кислотность, температуру или степень насыщения кислородом либо добавить определенные химические вещества.

В промышленном масштабе получать экзосомы пока не научились, но зато экзосомоподобные везикулы легко можно выделить из обычного молока. И такие структуры уже успешно опробованы в качестве переносчиков химиопрофилактических и химиотерапевтических препаратов. Также предпринимаются попытки разработать технологии создания искусственных экзосомоподобных везикул из клеточных мембран. Так, исследователи из Южной Кореи разработали технологию, позволяющую срезать с клеток фрагменты клеточной мембраны, которые потом сами собираются в везикулы диаметром 100—300 нм (Yoon, 2015)

и белки, которые можно проанализировать. Такие методы диагностики называют «жидкой биопсией», и они гораздо менее травматичны, чем обычная тканевая биопсия, и занимают меньше времени.

Именно на таком принципе работают диагностические наборы для обнаружения немелкоклеточного рака легкого и рака простаты производства компании *Exosome Diagnostics* (США). С их помощью определяют наличие особых «раковых РНК» в экзосомах, выделенных из крови пациента, что дает возможность поставить диагноз на ранней стадии болезни. Компания готовит представить подобные наборы для определения генетических мутаций при раке легкого, что важно для выбора стратегии лечения.

Ведутся исследования возможностей диагностики заболеваний и на основе белковых маркеров экзосом. К примеру, уже описаны белковые «палитры» экзосом, характерные для разных типов рака молочной железы, что позволяет детально характеризовать заболевание и отслеживать эффективность его лечения.

Экзосомы перспективны и как универсальные инструменты для адресной доставки в клетки терапевтических препаратов. За счет присутствия в мембране особых липидов и белков они могут специфично связываться только с определенными клетками. Сами же экзосомы практически не иммуногенны, нетоксичны, устойчивы в биологических средах и хорошо защищают свое содержимое от разрушения. А небольшой размер этих везикул позволяет им легко проникать в различные органы и ткани, минуя, в том числе, и гематоэнцефалический барьер, защищающий мозг.

С помощью экзосом можно доставлять в клетки не только химиопрепараты, но и терапевтические

нуклеиновые кислоты. Например, компания *Codiak* совместно с Онкологическим центром Андерсона при Техасском университете (США) разрабатывает на основе экзосом препарат для лечения рака поджелудочной железы. Известно, что одна из причин возникновения этого типа рака – мутация в *протоонкогене* *Kras*, которая приводит к синтезу мутантной формы соответствующего фермента и злокачественной трансформации клетки. Созданные исследователями экзосомы доставляют в раковые клетки малую молекулу РНК, специфичную к мутантному гену, что подавляет его работу по механизму *РНК-интерференции*. Это приводит к замедлению метастазирования и увеличивает выживаемость у лабораторных животных (Kamerkar, 2013).

Дальнейшие исследования в этой области могут привести к созданию эффективных лекарственных средств против разных видов рака.

Исследования в области экзосом сегодня находятся на переднем крае мировой науки. Множество научных коллективов и организаций занимаются изучением их строения, биогенеза, возможностей для применения в качестве диагностических маркеров и терапевтических средств. Такой работой занимаются и специалисты Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск): как приложениями экзосом в диагностике, так и их лекарственным «наполнением» для адресной доставки в клетки.

Несмотря на уже накопленную информацию, мы многое про экзосомы еще не знаем. Например, известно, что одни и те же клетки могут секретировать экзосомы с совершенно разными наборами молекул, но вот как именно функциональное состояние клеток влияет на содержимое экзосом, остается загадкой. Однако перспективы применения подобных структур в медицине очевидны, а дальнейшие фундаментальные исследования должны принести уже в ближайшее время много открытий.

Литература

Edgar J. R. Q&A: What are exosomes, exactly? // *BMC Biology*. 2016. V. 14. N. 1. P. 46.

Rani S., Ryan A. E., Griffin, M. D. et al. *Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications* // *Molecular Therapy*. 2015. V. 23. N. 5. P. 812–823.

Raposo G., Stoorvogel W. *Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends* // *Journal of Cell Biology*. 2013. V. 200. N. 4. P. 373–383.

Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells* // *Nature Cell Biology*. 2007. V. 9. N. 6. P. 654–659.



Виросомеры: старая форма, новое содержание

Природа создала множество биологических наноустройств и наномашин, элементы которых могут быть перепрограммированы для решения задач современной биологии и медицины. Одна из областей их применения – биофармацевтика. Молекулы белка, ДНК, РНК и их комплексы успешно применяются для конструирования терапевтических препаратов и вакцин. Это основа медицины будущего, которая будет базироваться на применении интеллектуальных лекарств, избирательно действующих на инфекционные агенты или на биополимеры, определяющие функционирование клеток человека

Ключевые слова: виросомеры, оболочки вирусов, вакцины, адресная доставка, вирус гриппа.

Key words: virosomes, virus envelope, vaccines, targeted delivery, influenza virus

© А. Л. Алексеева, А. И. Неуместова, М. А. Зенкова, 2017



АЛЕКСЕЕВА Анастасия Леонидовна – аспирантка, сотрудница лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), Автор и соавтор 4 научных работ



НЕУМЕСТОВА Александра Ильинична – аспирантка, сотрудница лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)



ЗЕНКОВА Марина Аркадьевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 252 научных работ и 18 патентов

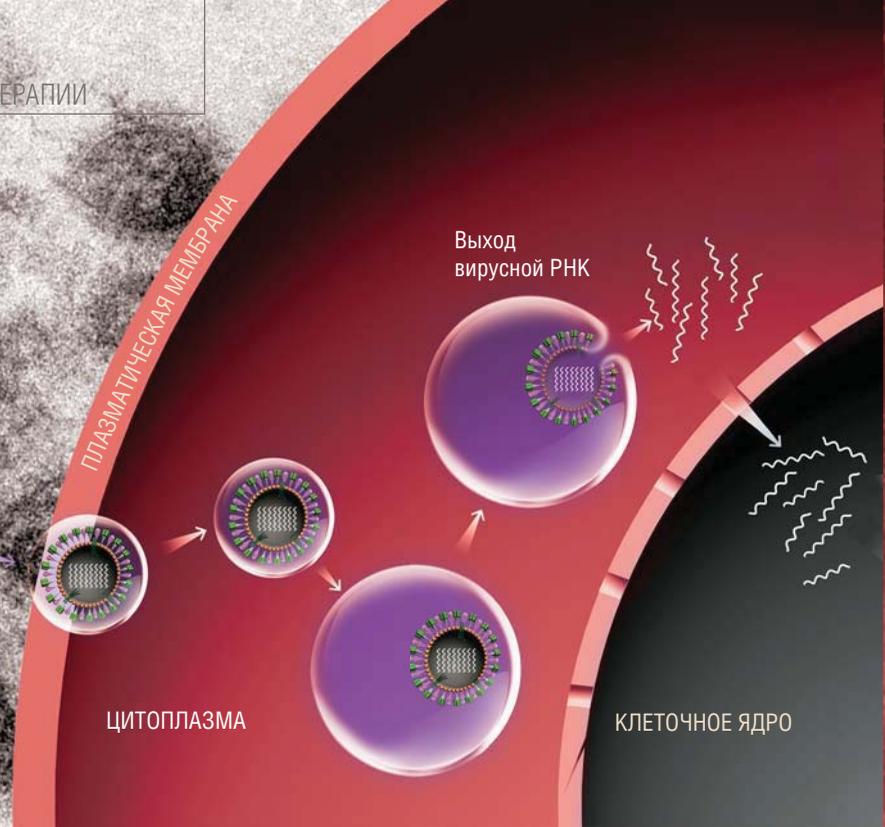
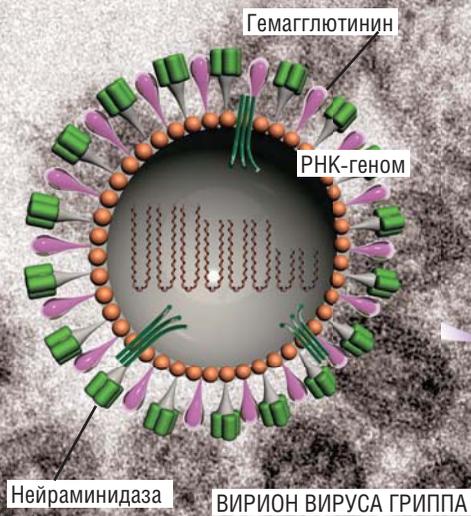
Вирусам, как важнейшему и хорошо изученному классу биологических нанообъектов, уже нашлось применение в прикладной медицине и разного рода фундаментальных исследованиях. Модифицируя вирусные геномы, ученые получают инфекционные агенты, избирательно поражающие раковые клетки; «ослабленные» вирусные частицы используют как живые вакцины; бактериофаги (вирусы – убийцы бактерий) – применяются в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности в качестве препаратов для борьбы с инфекциями. На основе генетического материала вирусов разработаны биотехнологические системы для наработки больших количеств белков в бактериях и культурах клеток. Элементы вирусной структуры все шире применяются для создания аналитических устройств, материалов для электроники и средств терапии.

Широкое использование вирусов обусловлено их уникальным строением и образом жизни: они полностью инертны вне организма хозяина и не имеют клеточного строения. Структура их генома очень разнообразна: вирусы могут содержать одну или несколько

молекул РНК или ДНК, которые могут принимать линейную, кольцевую или сегментированную форму.

Роль клеточного ядра, защищающего геном вируса, выполняет *капсид*, состоящий из структурных белков и ферментов. Более сложно организованные вирусные частицы могут иметь дополнительные оболочки – *суперкапсиды*. Эти липопротеидные структуры включают в себя *гликопротеины* – белки, взаимодействующие с поверхностными клеточными рецепторами, что обеспечивает проникновение вирусов внутрь заражаемой клетки. Вирус может содержать более одного типа гликопротеинов, например, у вируса гриппа их два: *гемагглютинины* и *нейраминидаза*.

Избирательное проникновение вирусов в клетки играет важную роль в их выживании. Вирион прикрепляется только к «подходящей» клетке, способной обеспечить его размножение. Проникновение вирусов в клетку может происходить по разным сценариям. Например, *вирус иммунодефицита человека* (ВИЧ-1), инфицируя клетку, сливается своей оболочкой с плазматической мембраной клетки и сразу попадает в цитоплазму. Альтернативный способ, который использует



На поверхности липидной оболочки вируса гриппа располагаются два типа гликопротеинов – гемагглютинины и нейраминидаза. Вирусная частица прикрепляется к клетке путем формирования комплекса между молекулами гемагглютининов и сиаловой кислоты на поверхности клетки, а затем проникает внутрь нее путем эндоцитоза – впячивания мембраны и формирования пузырьков. Высвобождение вирусной РНК из везикулы происходит при снижении рН внутри нее до значения 5.0. В результате мембрана вируса сливается с эндосомальной мембраной, и генетический материал выходит наружу и проникает в ядро клетки. По: (Рябчикова, 2009)

вирус гриппа, *эндоцитоз*, один из естественных процессов, которые клетка использует при захвате вещества из внешней среды.

Природные наноконтейнеры

Вирсомы можно использовать в качестве контейнеров для доставки лекарственных препаратов в клетки. Известно, что зачастую терапевтический потенциал лекарств, показанный ими в условиях «пробирки», не всегда может быть полностью реализован в организме из-за трудностей их транспортировки в клетки или преждевременной деградации в кровотоке. Для решения этих проблем пытались применять *липосомы* – искусственные липидные пузырьки, однако производить устойчивые липосомы, способные взаимодействовать только с определенными клетками, пока не научились.

Так возникла идея решить эту проблему с помощью *вирсом* – вирусных частиц, освобожденных от генетического материала, но содержащих поверхностные гликопротеины. Подобные частицы обладают важным свойством: сохраняют способность избирательно свя-

зываться с определенными клетками, доставляя в них свое содержимое.

Возможность доставки лекарственных средств с помощью вирсом была показана на примере подавления синтеза белков вируса гепатита С в организме животных. В вирсомы, сделанные на основе *вируса Сендай*, заключили короткие шпилечные РНК, способные ингибировать наработку белка вируса гепатита С в зараженных клетках. В результате внутривенного введения такого препарата удалось эффективно снизить количество исследуемого вирусного белка в клетках печени больных мышей (Subramanian *et al.*, 2009).

В некоторых случаях вирсомы необходимо «перепрограммировать» таким образом, чтобы нацелить их на определенные типы клеток. Эта задача становится особенно актуальной, когда речь идет о доставке лекарственных средств, провоцирующих клеточную гибель. В этом случае ошибки недопустимы.

Гликопротеины вируса гриппа можно ингибировать полиэтиленгликолем, после чего присоединить белки, способные специфично связываться только с определенными типами раковых клеток. В такой ситуации



Для получения виросом вирусные частицы разлагают на составляющие компоненты с помощью неионных детергентов, эффективно разрушающих межлипидные и липид-белковые связи и, как правило, не нарушающих структуру белков. Генетический материал вируса удаляют из раствора с помощью скоростного центрифугирования (около 100 000 g). При удалении детергента из оставшегося раствора происходит самосборка вирусной оболочки с сохранением первоначального набора белков. Для включения в виросомы лекарства его добавляют в раствор до удаления детергента. Один из подходов для включения макромолекул – проведение нескольких циклов замораживания-оттаивания виросом, при которых идет захват материала из раствора. Можно модифицировать липидную мембрану виросом (например, вводя холестерин), что повышает ее устойчивость, или присоединить к ней адресующие молекулы

Безопасные вакцины

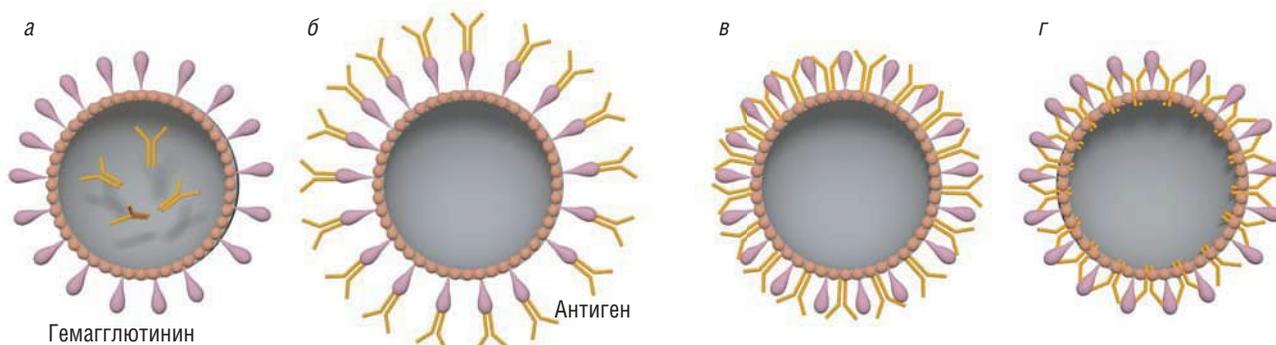
виросомы будут доставлять свое содержимое только в эти клетки-мишени. Пример удачного изменения специфичности виросом – это «перепрограммирование» виросом на основе вируса гриппа на эффективное слияние с клетками карциномы яичников (Mastrobattista *et al.*, 2001).

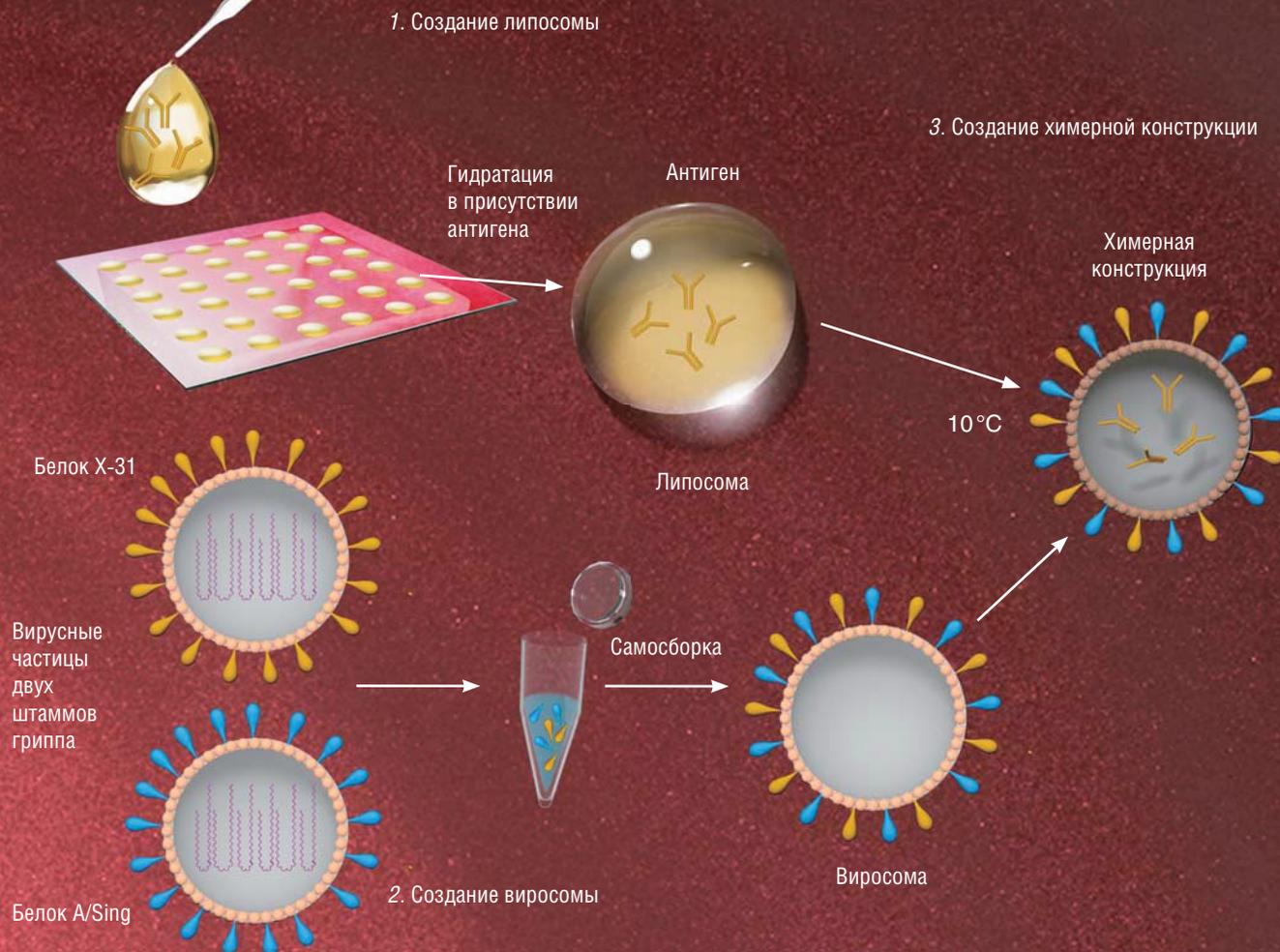
Виросомы, несущие в себе или на своей поверхности *антигены* (структурные компоненты патогенных микроорганизмов, провоцирующие иммунную реакцию в организме), могут играть роль вакцин и способствовать наработке в организме реципиента клеток иммунологической памяти Т- и В-лимфоцитов. В отличие от «живых вакцин», когда реципиенту вводят ослабленные вирусные частицы с инактивированным генетическим

Наиболее часто вакцинные препараты на основе виросом конструируют из вируса гриппа.

Причина – способность его белков-гемагглютининов связываться с молекулами сиаловой кислоты на поверхности антигенпрезентирующих клеток иммунной системы. Главная функция этих клеток – захват и презентация чужеродных белков лимфоцитам, отвечающим за развитие иммунного ответа и последующее формирование иммунологической памяти в организме.

Если виросома будет содержать такой чужеродный антиген, он также попадет в антигенпрезентирующие клетки, и в организме может сформироваться устойчивая защита от патогена. *Внизу* – варианты размещения антигена в виросомах на основе вируса гриппа: *а* – внутри виросомы; *б* – в комплексе с гемагглютинаинами; *в* – адсорбированные на мембране; *г* – погруженные в липидный слой





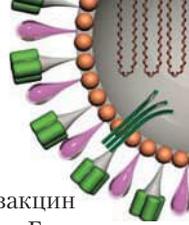
При создании виросом против вируса гепатита С исследователи предложили намного более эффективный метод включения макромолекул, чем использование детергентов с последующим замораживанием-оттаиванием. Согласно этому методу, антиген сначала вводят в липосому. Для этого липиды «высушивают» до состояния «сухой пленки», а затем проводят их гидратацию («размачивают») в присутствии антигена. В результате путем самосборки образуются липидные пузырьки, содержащие нужный антиген (1). Виросомы создают из вирусных частиц с использованием неионных детергентов, включая в них поверхностные белки-гемагглютинины двух штаммов вируса гриппа – X-31 и A/Sing, имеющие разный температурный диапазон активности (2). X-31 активен при низких (<math><20\text{ }^\circ\text{C}</math>) температурах и способен сливаться с липосомами, на поверхности которых отсутствует сиаловая кислота. Так образуется химерная конструкция, содержащая антиген (3). Гемагглютинины A/Sing, активные при температуре выше et al., 2005)

материалом, вакцинация виросомами не несет риска случайного заражения пациента.

Виросомы можно использовать не только для профилактики, но и для лечения таких заболеваний, как, например, гепатит С. Предполагают, что основную роль в борьбе с этой инфекцией играют цитотоксические CD8^+ Т-лимфоциты: эти клетки являются «профессиональными убийцами» внутриклеточных паразитов, недостижимых для системы гуморального иммунитета. «Увидев» антиген на мембране

антигенпрезентирующих клеток, CD8^+ Т-лимфоциты взаимодействуют с ним своими рецепторами, после чего созревают, активируются и уничтожают зараженные клетки. Для активации Т-клеточного иммунного ответа антиген должен попасть в антигенпрезентирующие клетки, и роль его носителя могут сыграть виросомы (Zubrrigen & Gluck, 1999).

Виросомы могут применяться в качестве вакцин не только против вирусов, но и других патогенов. Так, у мышей происходит наработка антител против



возбудителя малярии после введения им виросом на основе вируса гриппа, несущих на поверхности синтетические пептиды, соответствующие фрагментам белков плазмодия (Okitsu *et al.*, 2008). Эффективные вакцинирующие препараты были разработаны на основе виросом, содержащих дифтерийный и столбнячный токсины. Сравнение действия таких препаратов и *анатоксинов* (токсинов, вызывающих иммунный ответ, но не проявляющих токсикологических свойств и служащих традиционными вакцинами против дифтерии и столбняка) показало, что в первом случае антитела нарабатываются более эффективно (Zubriggen & Gluck, 1999).

Виросомы можно использовать и для иммунотерапии онкологических заболеваний – доставки в опухоль ассоциированных с раком антигенов в виде плазмидной ДНК или коротких пептидов. Такие виросомы способны активировать клетки иммунной системы даже более эффективно, чем антиген в нативном виде. В экспериментах на животных было показано, что антиген, специфичный для клеток меланомы Melan-A, доставляемый в виросомах на основе вируса гриппа, успешно проникает в *плазматические дендритные клетки* иммунной системы (популяция антигенпрезентирующих клеток крови). В результате происходит более эффективная активация Т-клеток, способных уничтожить раковые клетки, чем при введении свободного пептида. Этот эффект, по-видимому, обусловлен хорошей защищенностью антигена, находящегося в виросомах (Angel *et al.*, 2007).

Использование виросом в терапии болезней человека и животных имеет существенные достоинства, главные из которых – нетоксичность и совместимость с большинством лекарственных средств. Кроме того, липидная оболочка обеспечивает надежную защиту заключенного в виросомах материала от преждевременной деградации. С помощью виросом-опосредованной терапии уже удалось добиться весьма многообещающих результатов. Некоторые созданные на их основе препараты, в основном вакцины, находятся на разных стадиях доклинических и клинических испытаний. К их числу относятся интраназальные вакцины против вируса гриппа, вакцина против РСВ-вируса, ВИЧ-инфекции.

Примером коммерчески доступных виросомных вакцин является препарат *Инфлексал* производства Швейцарии, который представляет собой виросомы, содержащие антигены против вирусов гриппа типов А и В. В последнее десятилетие именно Швейцария занимает лидирующие позиции по числу средств, вкладываемых в исследование и разработку препаратов на основе виросом.

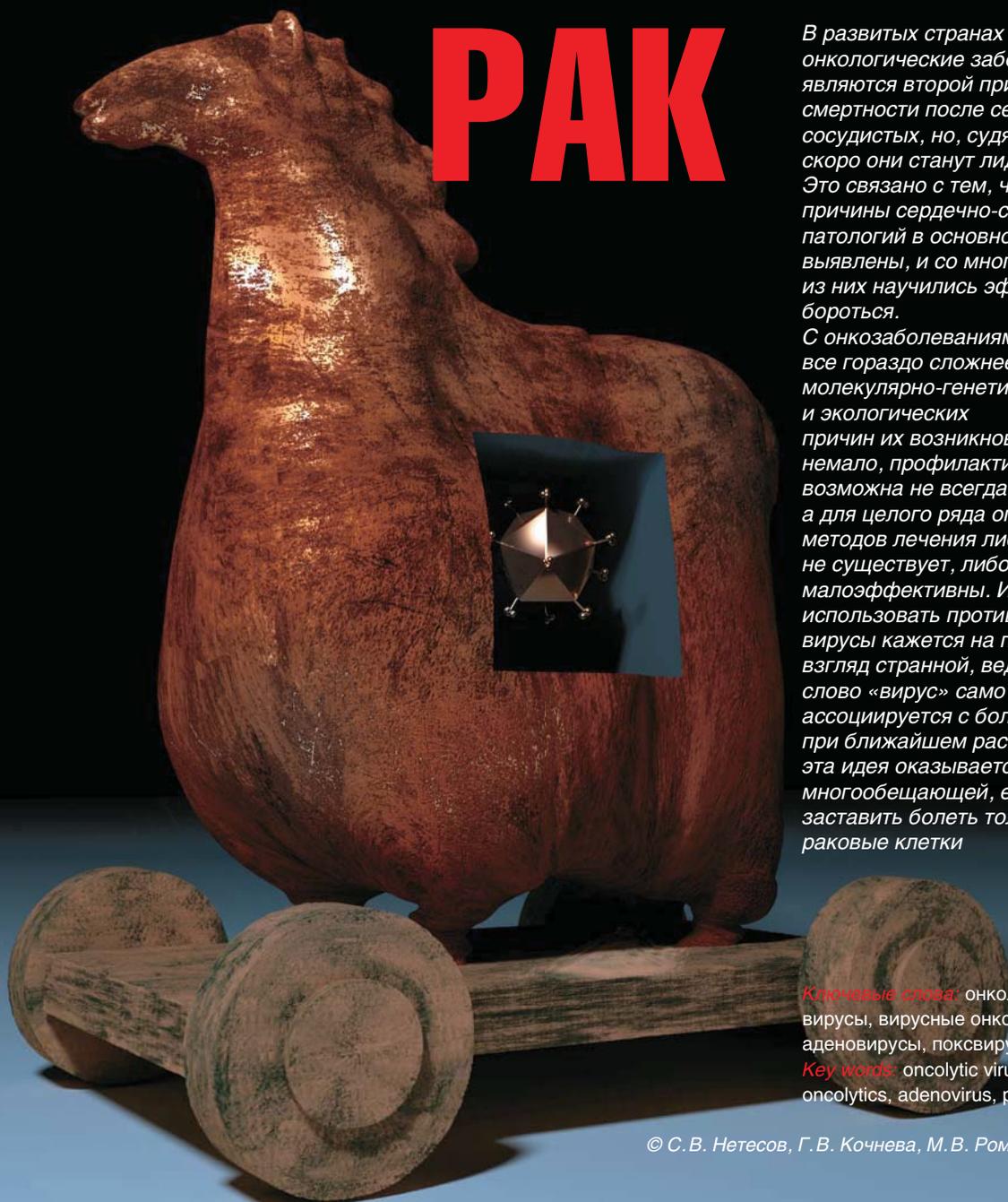
Среди отечественных аналогов виросомных вакцин против вируса гриппа следует упомянуть вакцину «Грифор», разработанную на базе НПО «Микроген» (Москва) и официально разрешенную к медицинскому применению на территории РФ в 2008 г. К отечественным противогриппозным вакцинам нового поколения относится препарат «Ультрикс», эффективный в том числе в отношении свиного гриппа (Шамшева и др., 2014).

На сегодняшний день в мире можно выделить несколько групп, занимающихся доставкой терапевтических нуклеиновых кислот, в том числе и *малых интерферирующих РНК* (siRNA), в клетки млекопитающих с помощью виросом (de Jonge *et al.*, 2006). Основные затруднения, с которыми приходится сталкиваться при приготовлении таких виросомных препаратов, связаны с эффективностью включения препарата в состав виросом, а также адресной доставкой в определенные типы клеток. Сегодня в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) ведутся работы по получению виросом стандартного качества со стабильными свойствами, в том числе обладающих способностью к адресной доставке терапевтических нуклеиновых кислот. Уже разработаны методы включения этих макромолекул в оболочки вируса (Власов и др., 1988, 1989). В дальнейшем планируется создать виросомные препараты, содержащие терапевтические нуклеиновые кислоты, и оценить их воздействие на различные типы раковых клеток человека.

Литература

- Власов В. В., Иванова Е. М., Кренделев Ю. Д. и др. Оболочки вируса Сендай и тени эритроцитов – мембранные переносчики для введения реакционноспособных производных олигонуклеотидов в клетки // *Биополимеры и клетка*. 1989. Т. 5. № 4. С. 52–58.
- Власов В. В., Кренделев Ю. Д., Овандер М. Н. и др. Эффективный метод включения ДНК в реконструированные оболочки вируса Сендай // *Биополимеры и клетка*. 1988. Т. 4. № 5. С. 250–254.
- Шамшева О. В., Ртищев А. Ю. Ультрикс – отечественная вакцина нового поколения // *Педиатрия*. 2014. Т. 93. № 6. С. 121–124.
- Angel J., Chaperot L., Molens J. *et al.* Virosome-mediated delivery of tumor antigen to plasmacytoid dendritic cells // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 3913–3921.
- de Jonge J., Holtrop M., Wilschut J. *et al.* Reconstituted influenza virus envelopes as an efficient carrier system for cellular delivery of small-interfering RNAs // *Gene Therapy*. 2006. V. 13. P. 400–411.
- Okitsu S. L., Mueller M. S., Amacker M. *et al.* Preclinical profiling of the immunogenicity of a two-component subunit malaria vaccine candidate based on virosome technology // *Human Vaccines*. 2008. V. 4 N. 2. P. 106–114.

КАК ВИРУСЫ ПОМОГУТ ВЫЛЕЧИТЬ РАК



В развитых странах онкологические заболевания являются второй причиной смертности после сердечно-сосудистых, но, судя по всему, скоро они станут лидерами. Это связано с тем, что причины сердечно-сосудистых патологий в основном выявлены, и со многими из них научились эффективно бороться.

С онкозаболеваниями все гораздо сложнее: молекулярно-генетических и экологических причин их возникновения немало, профилактика возможна не всегда, а для целого ряда опухолей методов лечения либо не существует, либо они малоэффективны. Идея использовать против опухолей вирусы кажется на первый взгляд странной, ведь слово «вирус» само по себе ассоциируется с болезнью. Но при ближайшем рассмотрении эта идея оказывается многообещающей, если заставить болеть только раковые клетки

Ключевые слова: онколитические вирусы, вирусные онколитики, аденовирусы, поксвирусы.

Key words: oncolytic viruses, viral oncolytics, adenovirus, poxvirus



НЕТЕСОВ Сергей Викторович – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета. Автор более 180 публикаций в международно цитируемых журналах, более 10 учебных пособий и монографий, более 20 патентов. Дважды Лауреат Премии Правительства России в области биомедицинских наук



КОЧНЕВА Галина Вадимовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор». Автор и соавтор 143 научных работ и 12 патентов



РОМАНЕНКО Маргарита Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии и вирусологии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор 28 научных публикаций, двух учебных пособий

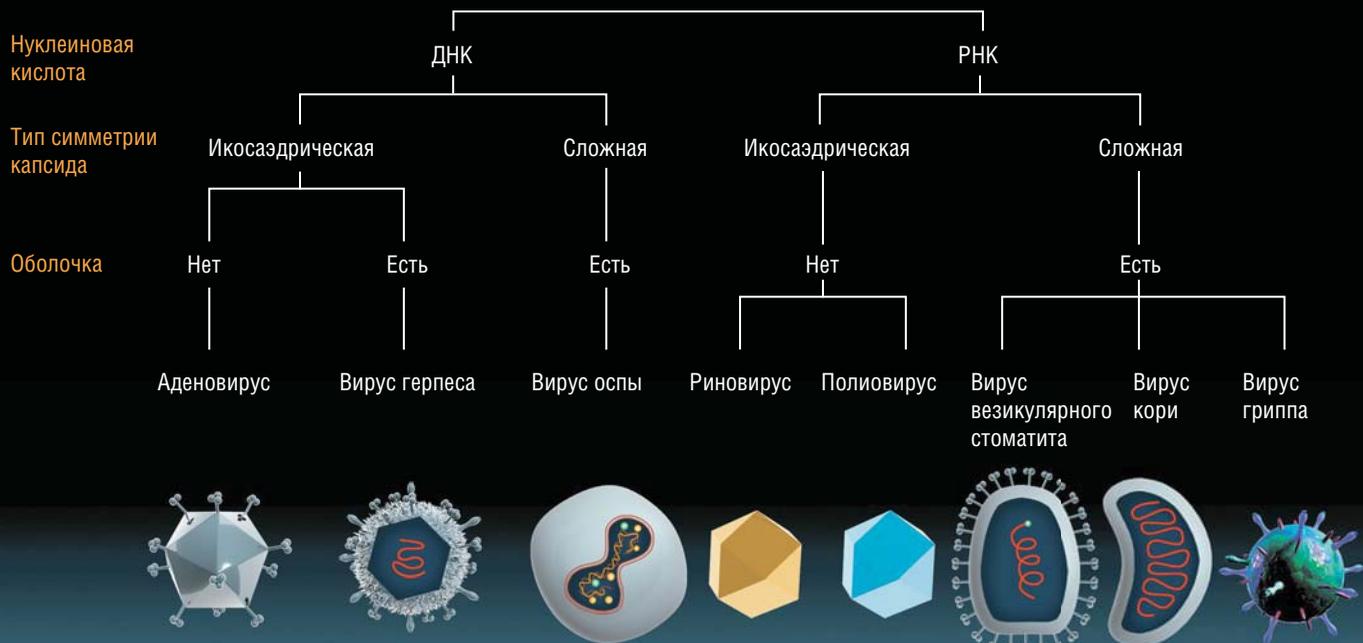
В 2015 г. в арсенале онкологов официально появился принципиально не новый, но новаторский по сути метод разрушения опухолей с помощью вирусов. Назвать его новым нельзя потому, что первые официальные публикации по его использованию, в ряде случаев успешному, появились еще в 1904–1910 гг. (Dock, 1904; De Pace, 1912). Тогда ученые описали сначала случайное, а затем и намеренное использование для лечения онкологических больных ослабленного (вакцинного) препарата *вируса бешенства*. Правда, широкого применения этот метод не получил, так как вакцина имела побочные эффекты, а результаты лечения было трудно предсказать.

В течение следующей сотни лет к этому методу неоднократно пытались вернуться. В 1950–1970-е гг. для лечения рака применялись непатогенные штаммы вирусов лихорадки Западного Нила, желтой лихорадки, вируса бешенства, аденовирусов, вируса болезни Ньюкасла и др. Иногда больные полностью выздоравливали, нередко случались и временные ремиссии. Но плохая предсказуемость результатов, незнание

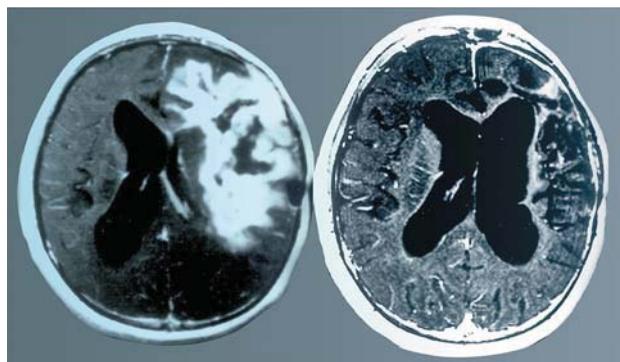
научно обоснованных механизмов действия вирусов на опухоль и предубеждения скептиков из контролирующих органов вынуждали врачей отступать.

Новая история онколитических вирусов

В 1990-е гг. начала развиваться более осознанная концепция создания онколитических вирусов. Произошло это после того, как удалось частично выяснить механизм противораковой активности полученного в США штамма аденовируса ONYX-015. Дело в том, что один из главных «стражей порядка» клетки – белок p53, обнаружив в ней вирус, запускает *апоптоз* (программируемую смерть), чтобы вирус не смог размножиться и заразить окружающие клетки. В клетках многих опухолей ген белка p53 поврежден, и размножение вируса ничего не сдерживает. У аденовируса, в свою очередь, имеется белок E1B-55K, который связывает p53 и не дает ему запускать апоптоз. Если ген, кодирующий этот белок, из вирусного генома удалить, то вирус сможет



Семейства онколитических вирусов, способных разрушать клетки опухоли. По: (Cattaneo, 2008)



Эти томограммы – свидетельство одного из самых поразительных случаев излечения рака с помощью вирусной терапии, описанного в Journal of American Medical Association (JAMA) в 1999 г. Больной – пятнадцатилетний подросток с глиобластомой, наиболее опасной и быстро развивающейся опухолью головного мозга. Лечение проводилось вирусом болезни Ньюкасла. Опухоль занимала значительный объем головного мозга, и никакое иное терапевтическое вмешательство было невозможно. По устному сообщению одного из авторов этой публикации, пациент в течение ряда лет был жив и успешно работал. По: (Csataryand, Bakacs, 1999)

Существует несколько подходов в лечении онкозаболеваний: хирургическое удаление опухоли; радиотерапия, т. е. разрушение опухоли введенными в нее радиоактивными препаратами или направленным лучевым воздействием; химиотерапия – применение лекарств, разрушающих быстро размножающиеся раковые клетки. Есть и более новые методики, основанные на активации иммунитета, при которых используются высокоспецифичные моноклональные антитела к антигенам опухоли, «метящие» раковые клетки и привлекающие к ним внимание клеток иммунной системы, которые и разрушают опухоль. Наконец, существует иммунотерапия с применением особым образом активированных Т-лимфоцитов самого пациента. Возможно и сочетание разных подходов

размножаться только в клетках опухоли, где к тому же р53 в большинстве случаев не работает.

Позднее выяснилось, что в отсутствие гена E1B не реализуется и вторая функция белка E1B-55K (O'Shea *et al.*, 2004), которая состоит в переносе из ядра в цитоплазму вирусных РНК, кодирующих белки вирусной оболочки. В опухолевых клетках эту функцию берет на себя не установленный до сих пор фактор. Таким образом, механизм действия ONYX-015 еще нуждается в дальнейшем исследовании. Кроме того, за перерождение клеток в раковые могут отвечать не только дефекты белка р53. Есть и другие механизмы ракового перерождения клеток, и в этом случае аденовирусы будут неэффективны.



ВИРУСЫ: «ЗДОРОВАЯ» КОНКУРЕНЦИЯ

«До недавнего времени было общепринято мнение, что все вирусы являются возбудителями тех или иных болезней и должны рассматриваться в качестве вредных для общества патогенных агентов, требующих только мер борьбы с ними... В начале 50-х годов появились сомнения в правильности такого суждения. В процессе экспериментов по изоляции вирусов из фекалий у здоровых детей, а также при изучении их свойств в опытах на обезьянах, других животных и в культурах тканей начали накапливаться данные, свидетельствующие о том, что некоторые условно патогенные и полностью непатогенные кишечные вирусы (энтеровирусы) могут обладать определенными полезными для организма свойствами <...>

В наших наблюдениях у большинства вакцинированных* детей были получены хорошие результаты, но у некоторых из них вакцинный вирус не «приживлялся» в кишечнике и антитела в крови детей не появлялись. Вирусологические исследования, проведенные как в нашей, так и во многих других лабораториях, показали, что на успех пероральной иммунизации против полиомиелита живой вакциной Сэбина неблагоприятно влияет конкуренция со стороны неполиомиелитных типов энтеровирусов, обитающих в кишечнике у многих детей с момента рождения и не влияющих на состояние их здоровья. Этот факт дал нам возможность подтвердить наличие симбиоза с организмом человека некоторых рас непатогенных сапрофитных энтеровирусов, способных в среде обитания конкурировать с живой вакциной Сэбина, а также с болезнетворными вирусами при соответствующих условиях <...>

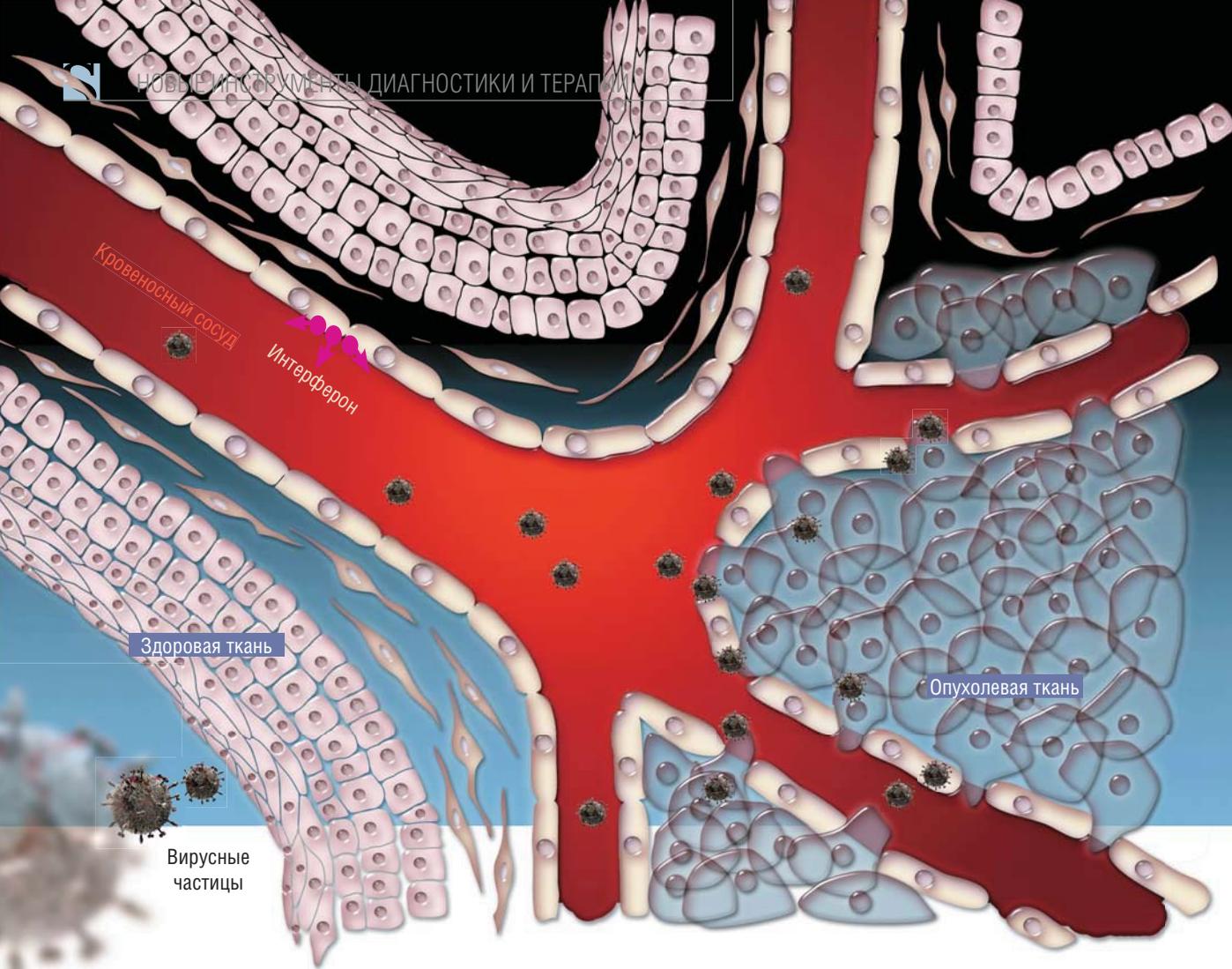
Нами был предложен новый принцип борьбы с энтеровирусными болезнями путем вытеснения болезнетворных вирусов

Д. м. н., чл.-корр. АМН СССР М. К. Ворошилова впервые открыла онкотропизм у группы непатогенных штаммов энтеровирусов и обосновала учение о полезных для организма свойствах непатогенных энтеровирусов-симбионтов кишечника. Она организовала и свыше двадцати лет руководила лабораторией иммунологии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов, ныне носящего имя его основателя, академика РАН М. П. Чумакова. Фото из архива сына М. К. Ворошиловой П. М. Чумакова

конкурирующими в среде обитания непатогенными энтеровирусами-симбионтами, и на их основе М. К. Ворошиловой были разработаны так называемые живые энтеровирусные вакцины (ЖЭВ) <...> В результате наших наблюдений и ряда исследований впервые было доказано существование нового для науки феномена – эффективного подавления болезнетворных вирусов непатогенными расами энтеровирусов-симбионтов кишечника благодаря конкуренции за среду обитания и интерферирующему воздействию с одновременной стимулирующей нескольких защитных систем организма. Селекционированные полезные вирусы-симбионты оказались способными вызывать онколиз (разрушение некоторых видов опухолевых клеток) и, кроме того, защищать в некоторых случаях лейкоцитарную систему в организме от губительного действия радиоактивного излучения. Это открытие имеет как общебиологическое теоретическое, так и медицинское практическое значение, обеспечивая новые возможности для профилактики и лечения ряда заболеваний»

По: (Ворошилова, 1988)

* Вакцинация против полиомиелита производилась живой вакциной Сэбина.

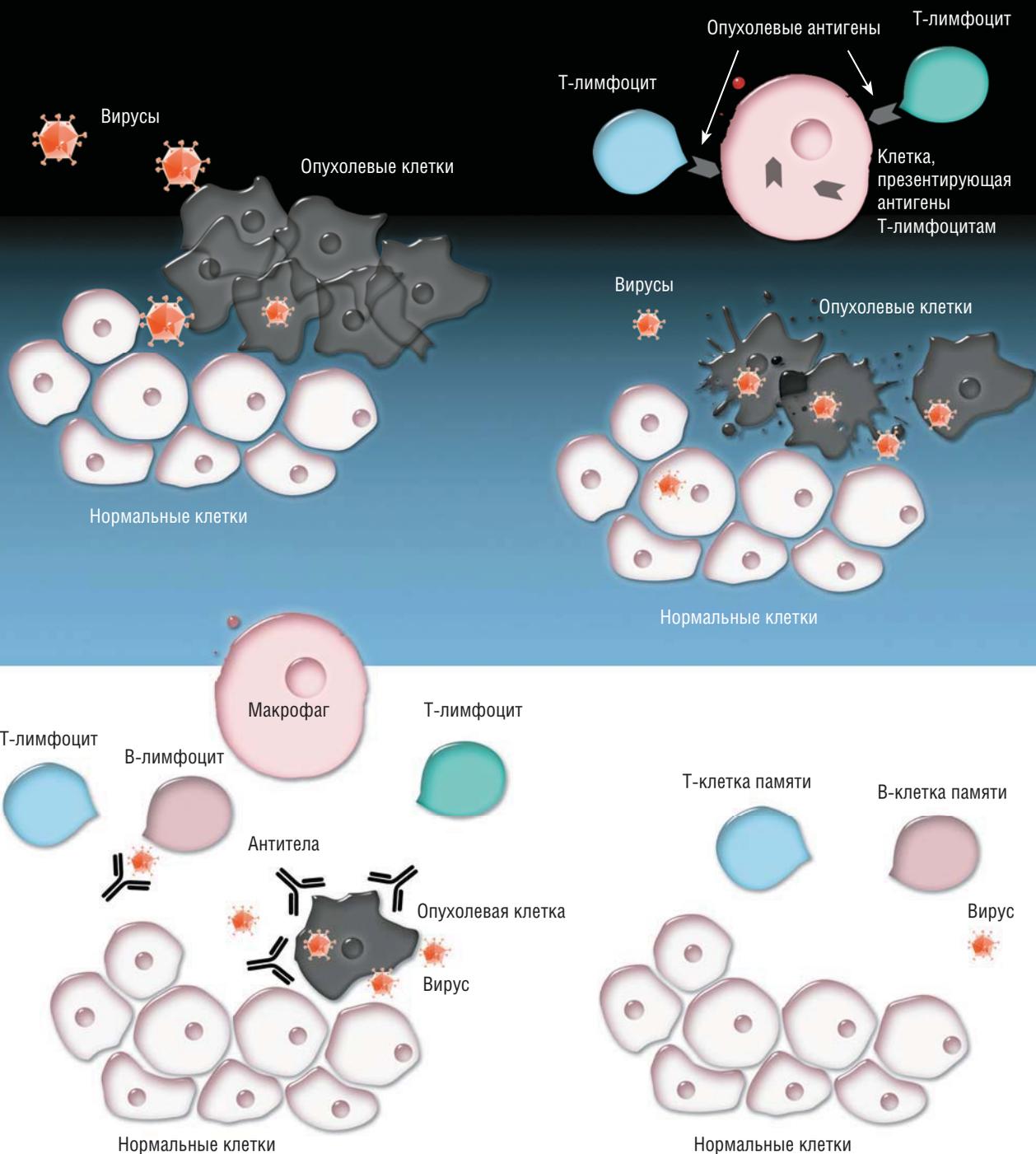


В норме мощным барьером против проникновения вируса и его распространения от клетки к клетке является сама архитектура живых тканей. Кроме того, здоровые клетки в ответ на инфекцию вырабатывают и секретируют противовирусный белок интерферон, придающий соседним клеткам невосприимчивость к вирусной инфекции. Опухоль же представляет собой хаотическое нагромождение плохо контактирующих друг с другом клеток, на которые могут легко адсорбироваться вирусные частицы, проникающие из кровотока. Кроме того, опухолевые клетки порой утрачивают механизмы противовирусной защиты, в том числе способность вырабатывать интерферон. Для вируса опухолевые клетки являются и преимущественным субстратом для размножения, так как они активно делятся и в них уже запущены процессы биосинтеза, необходимые для вирусной репликации

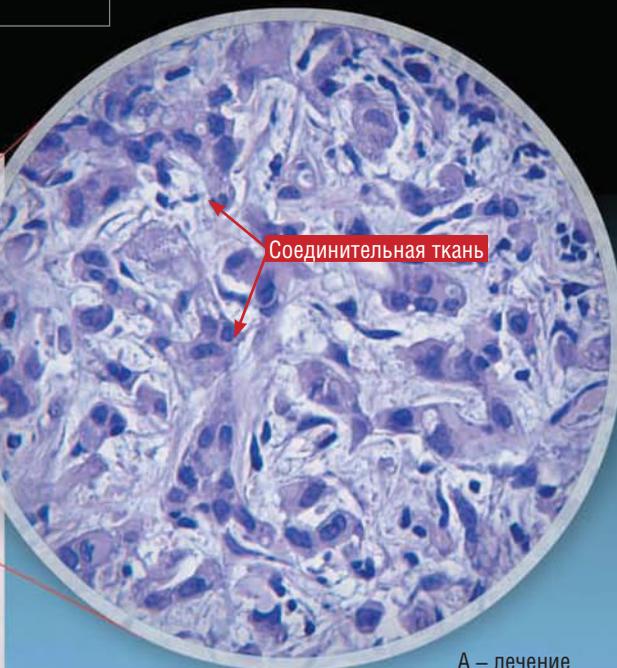
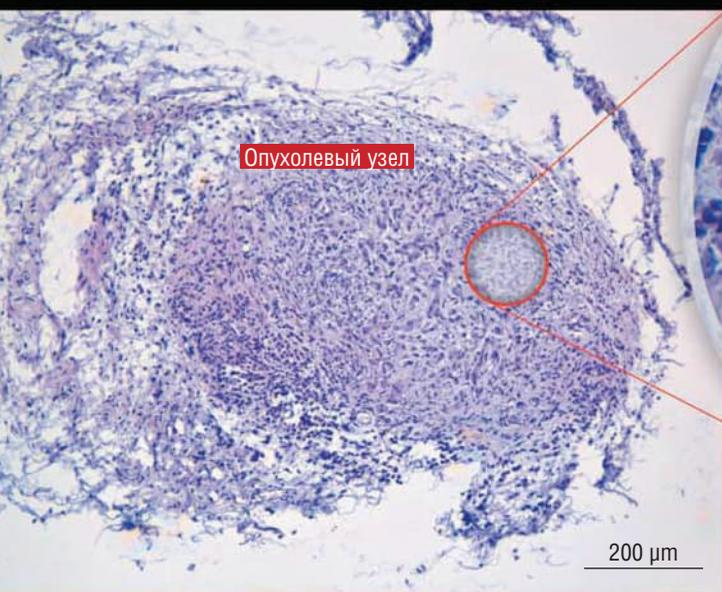
Все это привело к тому, что к концу 1990-х гг. разработки онколитических вирусов снова затихли. Однако аналог ONYX-015 под названием *онкорин* был разрешен для лечения некоторых типов онкобольных с опухолями головы и шеи в Китае, так же, как и рекомбинантный аденовирус с удаленным геном E1B и дополнительной вставкой гена p53 для усиления онколитических свойств (препарат *гендицин*) (Guo *et al.*, 2006).

В СССР исследования онколитических свойств вирусов были начаты в 1960–1970-х гг. в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (Московская обл.). Кроме изучения вирусов полиомиелита и разработок вакцин против них, в институте проводились более широкие исследования, в результате которых вакцинные штаммы вируса полиомиелита были применены для лечения рака. Кроме того, были выделены и типированы несколько других непатогенных для людей энтеровирусов, у которых обнаружились онколитические свойства.

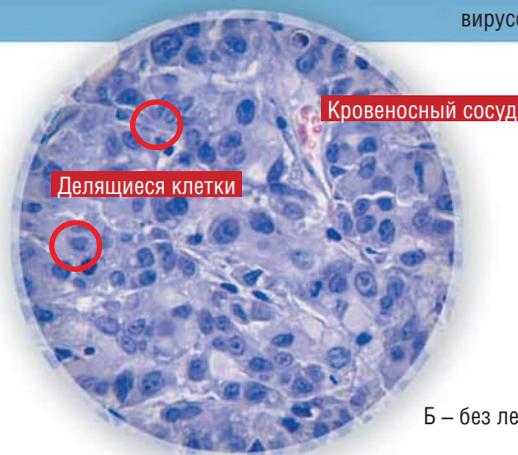
С онколитическими вирусами работала член-корр. АМН СССР доктор медицинских наук М. К. Ворошилова, и в ряде случаев ей удалось добиться серьезных успехов вплоть до полного исчезновения первичной опухоли и метастазов. Однако в 1970-х гг. ее эксперименты были запрещены. Поводом послужил недостаток данных о механизмах явления и молекулярной природе как вирусов, так и раковой опухоли. Уже после прекращения этих работ были



На сегодняшний день механизм действия онколитических вирусов представляется куда более сложным, чем просто лизис (разрушение) опухолевых клеток. Установлено, что в процессе такого разрушения высвобождается ряд опухолевых антигенов и различных факторов «опасности», что «пробуждает ото сна» клетки иммунной системы, которые начинают разворачивать против опухоли «боевые действия». При этом вирус активирует не только клеточный «фронт» иммунного ответа, но и другие молекулы, например провоспалительные цитокины, в результате чего иммунитет активизируется настолько мощно, что разрушиться может не только первичный очаг опухоли, в который была сделана инъекция вируса, но и метастазы (Matveeva *et al.*, 2015)


 А – лечение
онколитическим
вирусом

В экспериментах, проводимых в НГУ, ГНЦ ВБ «Вектор» и ИХБФМ СО РАН, лабораторных мышей линии *Nude* с привитой аденокарциномой человека AsPc-1 заражали онколитическим вирусом Коксаки В-6. Морфологическое исследование опухолевых узлов показало, что у мышей, получавших лечение, в ткани узла уменьшается число опухолевых клеток, а между ними разрастаются прослойки соединительной ткани (А). У мышей, не получавших лечение, узлы были заполнены активно делящимися опухолевыми клетками, соединительная ткань отсутствовала (Б). Фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск)



Б – без лечения

опубликованы два ее обзора, оба – в малодоступных изданиях: русскоязычном и зарубежном (Ворошилова, 1987; Voroshilova, 1989).

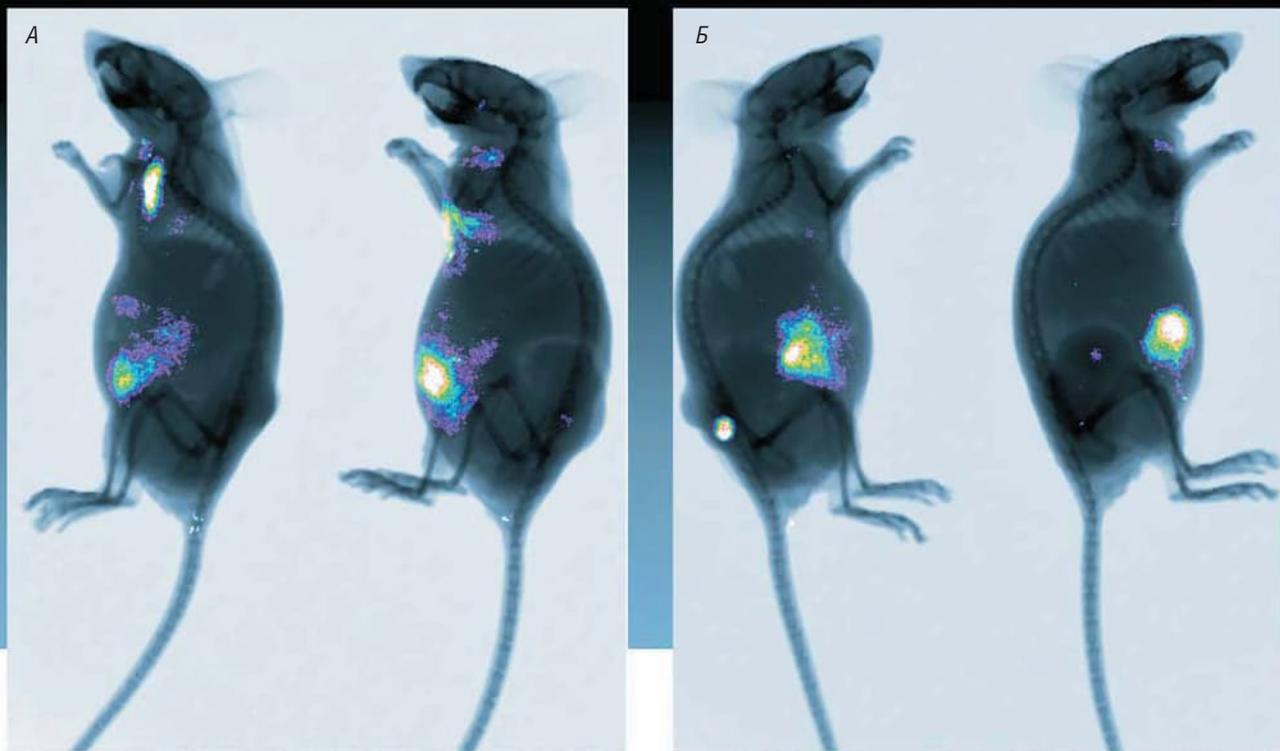
Позднее профессор В. В. Кешелова, работая в разных российских онкологических клиниках, использовал в терапии некоторых видов опухолей непатогенный для человека вирус болезни Ньюкасла (Keshelava *et al.*, 2009). Однако до широких клинических испытаний дело так и не дошло.

В 1998–2003 гг. в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск) был получен вариант аденовируса 5 серотипа с полностью удаленным геном E1B. Препарат на его основе был назван *канцеролизин* (Kachko *et al.*, 2003). Было показано, что он обладает онколитическими свойствами, сходными с ONYX-015 и онкорином. После проведения полного цикла доклинических испытаний этот штамм был допущен к клиническим испытаниям I фазы (Vdovichenko *et al.*, 2006), которые прошли

в 2007 г. в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина на восьми пациентах-добровольцах. Испытания показали хорошую переносимость препарата, а в одном случае наблюдался лечебный эффект, несмотря на то, что у всех больных была IV неизлечимая стадия болезни. Но найти источник финансирования последующих испытаний не удалось, а спустя несколько лет это стало неактуальным из-за появления вирусных онколитиков нового поколения.

Новейшая история: клинические испытания

За рубежом работы с онколитическими вирусами за последние десять лет получили мощное развитие. Вначале они в основном развивались в Канаде, и канадское Агентство здравоохранения даже финансировало некоторые проекты в США.



В октябре 2015 г. Управление по контролю качества пищи и лекарств США (FDA USA) официально разрешило клинические испытания III фазы генно-инженерного штамма герпесвируса под названием *имлиджик (Imlygic)* для лечения больных с рецидивирующей меланомой. Штамм герпесвируса, содержащий в геноме *аттенуирующие* (снижающие патогенные свойства) мутации и человеческий *ген гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующего фактора* для усиления противоопухолевого эффекта, был разработан американской компанией *Bio Vex, Inc.* Эту разработку и саму компанию вместе с правами на препарат в 2011 г. поглотил фармацевтический гигант *Amgen*. В конце 2015 г. препарат был официально разрешен к применению и в Европе.

Также в 2015 г. получил разрешение на проведение III фазы клинических испытаний препарат на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины *Пекса-Век (Pexa-Vec, JX-594)* для лечения *гепатоцеллюлярной карциномы* (рака печени). Этот препарат был получен из штамма вируса осповакцины *Wyeth*, у которого для уменьшения побочных реакций удалили ген тимидинкиназы и добавили ген гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующего фактора человека. Препарат сейчас интенсивно исследуют на добровольцах (информация об этом – на сайте <http://www.pexavetrials.com>). Результаты

Мышам линии *Nude* подкожно прививали клетки карциномы человека A431 в двух удаленных друг от друга точках. Один из двух сформировавшихся «ксенографтов» использовали для лечения рекомбинантным вирусом осповакцины (А), а второй играл роль метастаза (Б). Лечение проводили путем однократного введения внутрь опухоли аттенуированного рекомбинантного вируса осповакцины с делециями (утратой) двух генов вирулентности – вирусного ростового фактора и тимидинкиназы, на место которого был встроен ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Вирус обнаруживался в клетках искусственного метастаза уже через 2 суток после инфицирования, а через 8 суток достигал концентраций, сравнимых с инфицированной опухолью (~ 10⁹ инфекционных вирионов/мкг). Исследование органов и тканей мышей показало избирательное размножение рекомбинантного вируса в опухолевых клетках. Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12, а метастаза – через 20 суток после инъекции вируса. Исследование показало, что аттенуированный рекомбинантный вирус осповакцины даже при локальном периферическом способе введения не только способен разрушать ткань первичного опухолевого узла, но и обладает отчетливым антиметастатическим действием (Kochneva *et al.*, 2016). *На фото* – прижизненные УФО-изображения мышей, демонстрирующие адресное накопление флуоресцентного белка GFP в узлах опухолей (А) и метастазах (Б) двух мышей

нескольких независимых клинических испытаний I и II фазы положительны, а испытания III фазы проводятся в клиниках нескольких десятков стран мира.

Сейчас онколитические препараты на основе вирусов разрабатываются и начинают применяться во многих странах. В Канаде это – аденовирусы и рекомбинантные вирусы осповакцины, в Финляндии – рекомбинантные аденовирусы, в Японии – рекомбинантные герпесвирусы, в Латвии – энтеровирусы. В США – целый ряд вирусов, включая рекомбинантный аттенуированный герпесвирус, вакцинный штамм вируса кори и вакцинные штаммы вируса гриппа. В Великобритании начинаются клинические испытания вакцинного штамма вируса гриппа на больных раком печени.

В России подобные разработки также продолжаются. В 2010 г. Новосибирский государственный университет получил мегагрант, руководителем которого стал известный российский молекулярный биолог П. М. Чумаков (сын М. К. Ворошиловой), а ведущими исполнителями – авторы этой статьи (Нетесов и др., 2013). В результате в НГУ фактически с нуля была создана хорошо оборудованная научно-исследовательская лаборатория в комплексе с практикумом по микробиологии, опубликованы обзорные статьи по онколитическим вирусам (Kochneva *et al.*, 2012; Жираковская и др., 2012; Чумаков и др., 2012; Святченко и др., 2012), получены и охарактеризованы первые кандидатные штаммы онколитических энтеровирусов, парамиксовирусов и ортопоксвирусов.

К сожалению, существенного финансирования в последующие годы добиться не удалось. Тем не менее усилиями неформального коллектива сотрудников НГУ, ГНЦ ВБ «Вектор» и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН уже вне рамок мегагранта получены рекомбинантные штаммы вируса осповакцины с противораковыми свойствами, показавшие перспективность на животных моделях (Kochneva *et al.*, 2014; Kochneva *et al.*, 2017). Охарактеризованы и паспортизованы онколитические штаммы парамиксовируса Сендай (Matveeva *et al.*, 2015), сконструированы плазмиды с геномом аденовируса 6 серотипа, крайне перспективные для получения новых рекомбинантных онколитических штаммов со встройками генов, усиливающих лизис опухоли.

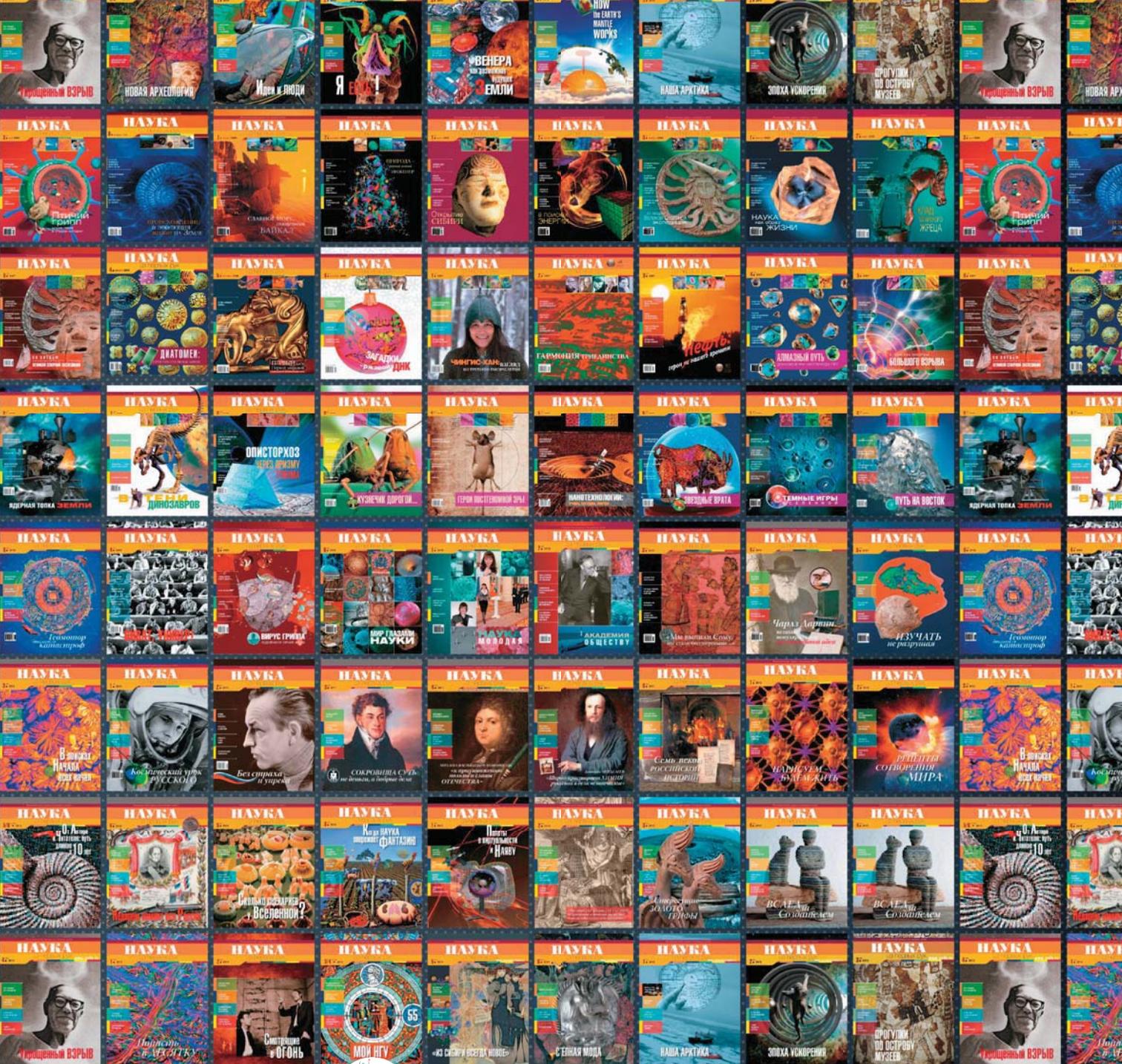
Сегодня у отечественных исследователей есть все основания работать дальше, проводить полноразмерные доклинические исследования и клинические испытания онколитических вирусных штаммов. Очень важно, преодолев предубеждения, дать «зеленый свет» и финансирование исследованиям этих крайне перспективных препаратов, разработанных в России.

Но пока существует недоверие к потенциально полезным противораковым вирусам, боязнь их патогенных свойств превалирует. И это удивительно, потому что широко используемые в настоящее время для борьбы с онкозаболеваниями химиопрепараты вызывают массу вредных побочных эффектов. Механизм действия большинства из них таков, что эти лекарства поражают не только раковые, но и здоровые, активно делящиеся клетки. Хорошо известно, что химиотерапия иногда приводит к преждевременной гибели больных, но ее применяют, потому что зачастую другого способа лечения онкобольных нет.

Попутно возникает еще один интересный вопрос о роли вирусов в нашей жизни. Ведь некоторые из них, как и бактерии, обитают в нашем теле, не нанося ему вреда. Может быть, роль вирусов, по крайней мере некоторых из них, как раз и состоит в защите от раковых клеток? И они лишь иногда вызывают заболевания, выйдя из-под контроля? Ответы на эти вопросы должны стать предметом будущих исследований, если мы хотим добиться прорыва в борьбе с онкозаболеваниями.

Литература

- Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В. и др. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы // *Молекулярная биология*. 2012. Т. 46. С. 556–569.
- Dock G. Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma // *Am. J. Med. Sci.* 1904. V. 127. P. 563–565.
- Guo J.; Xin H. Chinese gene therapy. Splicing out the West? // *Science*. 2006. V. 314. N. 5803. P. 1232–1235.
- Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A. et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression // *Oncotarget*. V. 5. N. 22. 2014. P. 11269–11280.
- Kochneva G.V., Tkacheva A.V., Sivolobova G.F. et al. Antitumor potential of recombinant vaccinia virus strain, which produces a secreted chimera protein, composed of human GM-CSF and oncotoxic peptide lactaptin // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2017. V. 9. N. 1. P. 11–21.
- Tarasova M. V., Demidova E. V., Kochneva G.V. et al. The construction of adenovirus type 6 vector with replication control under the human telomerase reverse transcriptase promoter. Collaborative Congress of the European-Society-of-Gene-and-Cell-Therapy (ESGCT) and Finnish-Society-of-Gene-Therapy. Helsinki, Finland. SEP 17-20, 2015. HUMAN GENE THERAPY. V. 26. № 10. P. A101-A102.
- Voroshilova M.K. Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease // *Prog. Med. Virol.* 1989. V. 36. P. 191–202.
- Vdovichenko G.V., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A. et al. Preclinical studies of the anticancer adenovirus cancerolysin preparation // *Vopr. Virusol.* 2006. V. 51. N. 6. P. 39–42.



НАУКА
из первых рук

SCIENCE
First Hand

Теперь Вы можете **ОФОРМИТЬ И ОПЛАТИТЬ ПОДПИСКУ**
НА ЭЛЕКТРОННУЮ ВЕРСИЮ (pdf) на сайте журнала www.scfh.ru:

http://scfh.ru/sub_re/ на русском языке
http://scfh.ru/en/sub_re/ на английском языке

ВЕСЬ АРХИВ журнала с 2004 по 2016 гг. – на сайте: <http://scfh.ru/archive/> –
на русском языке, <http://scfh.ru/en/archive/> – на английском языке

ПОДПИСКА

Стоимость подписки на полугодие – 840 руб.
Стоимость подписки на год – 1680 руб.

На сайте журнала «НАУКА из первых рук» www.scfh.ru вы можете:

● **Оформить подписку на печатную версию журнала**

3 номера печатной версии журнала, второе полугодие 2017 г. – 840 руб.

6 номеров печатной версии журнала, 2017 г. – 1680 руб.

В стоимость подписки включена доставка журнала заказной бандеролью.

Оригиналы бухгалтерских документов для юридических лиц (договор, счет-фактура и накладная) будут высланы Вам почтой.

● **Купить отдельные выпуски печатной версии журнала «НАУКА из первых рук»**

● *Печатные выпуски журнала доставляются по почте*

Способы оплаты

Электронные платежи: через систему приема платежей Робокасса (банковскими картами, с помощью сервисов мобильной коммерции – МТС, Мегафон, Билайн – через интернет-банк ведущих Банков РФ, через банкоматы и т. д.)

С помощью квитанции: после оформления заказа Вам будет выслана квитанция ПД-4 для оплаты заказа в ближайшем отделении Вашего Банка

● **По всем вопросам обращаться:**

Тел.: 8 (383) 330-27-22
Факс: 8 (383) 330-27-22
e-mail: zakaz@info-press.ru

● **Платежные реквизиты:**

ООО «ИНФОЛИО»
ИНН 5408148073, КПП 540801001
Р/счет 407 02 810 523 120 001 110
в Филиале «Новосибирский»
АО «АЛЬФА-БАНК»,
г. Новосибирск
Кор/счет 30101810600000000774
БИК 045004774

● **Оформить подписку на электронную версию журнала (PDF)**

3 номера электронной версии журнала (PDF), второе полугодие 2017 г. – 290 руб.

6 номеров электронной версии журнала (PDF), 2017 г. – 590 руб.

Оплаченный номер электронной версии журнала (PDF) Вы получаете сразу после выхода очередного номера на указанный Вами адрес электронной почты

● **Купить отдельные выпуски электронной версии журнала «НАУКА из первых рук» (PDF)**

Получить электронный доступ

- к статье за 29 руб., к выпуску за 79 руб.,
● ко всем статьям на сайте журнала:
на 1 мес. за 99 руб., на 6 мес. за 299 руб.,
на 12 мес. за 599 руб.

При покупке электронного доступа вы получаете возможность читать статьи сразу после успешной оплаты.

По адресу <http://scfh.ru/en/> Вы можете получить электронный доступ к англоязычной версии журнала *SCIENCE First Hand*

● **Подписка на печатную версию по каталогам:**

Агентство «Урал-Пресс»: www.ural-press.ru

Агентство «Деловая пресса»: www.delpress.ru

БиблиоРодина:

<https://biblio.planeta.ru/books?bookId=46>

Информнаука: www.informnauka.com

МК-периодика: www.periodicals.ru

Юнисервиспресс: www.uspress.ru/

Подписка на электронную версию журнала:

Научная электронная библиотека:
www.e-library.ru

Пресса.ру: www.pressa.ru

В стоимость подписки включена доставка журналов заказной бандеролью

В мире науки

SCIENTIFIC
AMERICAN

Ежемесячный
научно-
информационный
журнал

www.sci-ru.org

№ 8-9 2017

Квантовый мультимир

Удивительная связь космологии и квантовой механики смогла бы раскрыть секреты пространства и времени.

Искусственный интеллект становится более человеческим

ИИ переживает второе рождение: теперь его создают на основе информации о том, как учатся дети.

Разгадка тайны болезни Лу Герига

Недавно выявленные мутации открывают путь к выяснению генетической природы страшного недуга, долгое время считавшегося неизлечимым.

Неприятная правда о снижении веса

Чтобы похудеть, надо сжигать больше калорий, чем потреблять, и то, что вы едите, намного важнее того, сколько вы занимаетесь физическими упражнениями.



Замысловатая сеть памяти

Техническая революция обеспечивает понимание того, как мозг связывает одно с другим воспоминания — процесс, имеющий решающее значение в формировании нашей картины мира.

Как города могут нас спасти

Территории городов способны улучшить планету и нашу жизнь, если проектировать их с прицелом на гораздо большее количество таких ресурсов, как энергия, вода, пища и минералы.

Черные дыры из начала времен

Скрытая «популяция» черных дыр, возникших менее чем через секунду после Большого взрыва, может наконец дать объяснение феномену темной материи.

Реклама





Эти каменные всадники много веков стоят в горах Пир-Панджал в Малых Гималаях (Индия). Они хорошо известны местным жителям, но никто не знает кто они, когда появились, что означают. Их исследование, проведенное в июне 2017 г. совместной российско-индийской экспедицией под руководством чл.-корр. РАН, д.и.н. Н.В. Полосьмак (Институт археологии и этнографии СО РАН, Новосибирск) открывает новые страницы в истории Индии

ISSN 18-10-3960

