**Департамент образования города Москвы**

**Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение города**

**Москвы «Школа №1505 «Преображенская»**

**Персонализированная медицина: текущее состояние и перспективы развития.**

Реферат

ВЫПОЛНИЛА

ученица 9 В класса

Сазонова Екатерина Максимовна

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

Свешникова Анастасия Никитична

РЕЦЕНЗЕНТ

Свешникова Анастасия Никитична

Москва, 2023 г.

**Содержание.**

ВВЕДЕНИЕ

0.1 Основные понятия персонализированной медицины.

0.2 Предпосылки и краткая история становления.

ГЛАВА 1. Теория, преимущества и препятствия персонализированной медицины.

1.1 Биомаркёры и их роль. Фармакогенетика и фармакогеномика.

1.2 Классические субпопуляции пациентов и причины разных подходов к лечению.

1.3 Требования к методу фармакогенетического тестирования.

1.4 Персонализация фармакотерапии на фенотипическом уровне на примере астмы.

1.5 Препятствия практического внедрения персонализированной модели здравоохранения.

ГЛАВА 2. Лабораторные методы секвенирования ДНК.

2.1 Классические методы молекулярной диагностики (скринирующие и сканирующие).

2.2 Методы, основанные на количественной ПЦР в реальном времени.

2.3 Микроматричный анализ.

2.4 Однонуклеотидное удлинение праймеров.

2.5 Капиллярное секвенирование (секвенирование по Сенгеру).

2.6 Технологии МПС.

Выводы. Предпринятые шаги и необходимые меры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

**Введение.**

**Проблема:** Персонифицированная (или персонализированная) медицина — малоизученный, но перспективный раздел генетики. Её развитие может улучшить качество жизни человека. Однако из-за малого количества информации о ней возникают сложности с её развитием.

**Цель:** Обзорное описание состояния этого раздела науки и принятых решений для его развития.

**Задачи:**

Изучить по литературным источникам и описать следующие вопросы:

1. Появление раздела и определение его деятельности.
2. Лабораторные методы персонализированной медицины (гл 2).
3. Преимущества персонализированной медицины и необходимость её внедрения (гл 1).
4. Перспективы и уже предпринятые шаги (выводы).

**0.1 Основные понятия парадигмы персонализированной медицины.**

* Медицина индивидуализированная — с акцентом на то, что речь идет об индивидуальном подходе к каждому пациенту;
* Медицина прецизионная — дословно более «точная», в понятии отражающая большую объективность к диагностике и лечению;
* Медицина предиктивная — для множества заболеваний присутствует возможность определения предрасположенности к их развитию;
* Медицина стратифицированная — подразумевается, что гетерогенность каждого заболевания делает необходимым соответствующее разделение, то есть стратификацию пациентов на группы, лечение в которых будет различаться в зависимости от ряда критериев, в том числе генетических особенностей (Под генетической гетерогенностью наследственных болезней подразумевают феномен, когда клинически единое заболевание может быть обусловлено мутациями в разных генах (локусная гетерогенность) или, напротив, когда мутации в одном гене обусловливают различные по тяжести клинические формы одного заболевания либо разные по клиническим проявлениям заболевания (аллельная гетерогенность)) [2].

Следует также различать причины гетерогенности. В настоящий момент выделено 4 группы причин гетерогенности [3]:

1. Генетические, могут быть обусловлены суммарным действием генов либо с равномерно разделённым влиянием, либо с наличием одного главного и других, оказывающих модифицирующее влияние на клинические проявления.
2. Эпигенетические, когда в ходе изменений генома не меняется структура ДНК, а экспрессию генов определяют вариации статуса метилирования ДНК и/или вариации структурной организации хроматина. Такие изменения способны передаваться не только в клеточном делении, но также и в половом размножении, а частота таких эпимутаций гораздо выше той же генной мутации.
3. Средовые (или условные). Их роль вместе со следующими, случайными, очевидна, но их взаимодействие с наследуемыми факторами мало изучено.
4. Стохастические (или случайные).

Среди же наиболее распространённых определений этого раздела науки можно выделить следующие:

1) по определению Коалиции персонализированной медицины [4]: «Персонализированная медицина — развивающаяся область, в которой врачи используют диагностические тесты для определения того, какие виды медицинского лечения будут действовать наилучшим образом на каждого пациента, а также использовать медицинские вмешательства для изменения молекулярных механизмов, влияющих на здоровье»;

2) по определению Президентского совета по науке и технологиям США [5]: «Прецизионная медицина — область медицины, учитывающая индивидуальные различия в генах, микробиомах, среде, семейном анамнезе и образе жизни для определения стратегии диагностики, лечения и профилактики, точно направленных на конкретного пациента»;

3) по определению Национального института рака США [6]: «Персонализированная медицина — подход к медицинской практике, использующий информацию о генетических, биохимических, а также внешних средовых факторах для профилактики, диагностики и лечения заболеваний».

**0.2 Предпосылки и история становления раздела науки.**

Начало роста числа публикаций отмечается в период с 1999 по 2001 год, что обусловлено завершением проекта “Геном человека”, позволившего прочитать нуклеотидные последовательности всех генов человека. Это позволило делать прогнозы о “геномной медицине”, когда заболевание будет диагностироваться на уровне генома, а лечение будет назначаться с учётом генетических особенностей пациента.

В качестве предпосылок вышеупомянутого роста актуальности персонализированного подхода может быть назван ряд вполне объективных факторов, главными из которых являются следующие:

* завершение проекта «Геном человека»;
* совершенствование и повышение доступности методов молекулярно-генетической диагностики;
* возрастающая необходимость оптимизации расходов на исследование и разработку новых лекарственных средств;
* прогрессирующее снижение числа инновационных разработок лекарственных средств, необходимость поиска путей эффективного использования уже имеющихся ЛС;
* углубление знаний по молекулярным аспектам фармакокинетики и фармакодинамики ЛС;
* высокая частота нежелательных лекарственных реакций / низкая эффективность при эмпирическом (традиционном) подборе фармакотерапии путем проб и ошибок;
* повышение запросов общества и регулирующих инстанций на увеличение эффективности оказываемой медицинской помощи.

Одна из отличительных черт современного этапа развития ПМ это, конечно же, её неразрывная связь с прогрессивными исследованиями в различных областях фундаментальной биологии. Начало XIX века ознаменовано становлением так называемых «-омикс»-технологий, которые предполагают комплексное изучение живых систем на всех уровнях реализации генетической информации, начиная от совокупности генов и заканчивая уникальным метаболическим профилем. Следует отметить, что на данный момент больше всего развита именно геномика. Другие направления «-омиксных» исследований находятся на относительно ранних этапах становления и говорить о их прямом клиническом применении на текущий момент преждевременно.

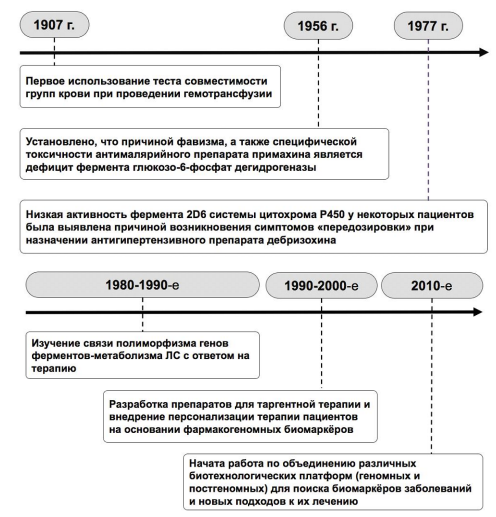
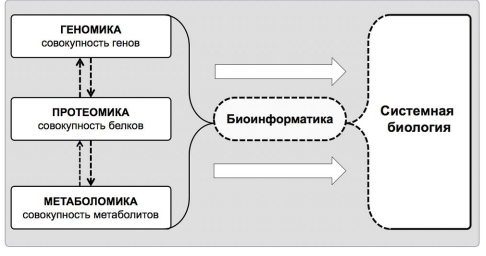
рис. 1 краткая история появления и становления ПМ.

рис. 2. появление “-омикс”-технологий.

**Глава 1. Теория, преимущества и препятствия персонализированной медицины.**

**1.1 Биомаркёры и их роль. Фармакогенетика и фармакогеномика.**

Достижения биомедицины призваны быть мощным подспорьем еще одной чрезвычайно отчетливой тенденции — возрастания роли биомаркеров и понимание широчайших возможностей их практического применения. Официальным определением биомаркеров является следующее: «Биомаркеры — объективно определяемые характеристики, служащие индикаторами протекания нормального или патологического процесса, либо фармакологического ответа пациента на терапевтическое вмешательство».

В классификации биомаркеров принято выделять 2 группы: по природе биомаркера (1) и по его значению (2). 

Конечно, нельзя утверждать, что до этого не существовало индивидуализации пациентов, что не позволяет говорить о персонализированной медицине как об абсолютно новой парадигме. Однако изначально эта индивидуализация носила эмпирический характер (и по большей части сохраняет его до сих пор), в то время как персонализированная медицина позволяет использовать научно-обоснованные методы индивидуализации фармакотерапии. Также можно сказать, что в современной практической медицине главенствующими должны считаться принципы медицины, основанной на доказательствах, — стандарты и утвержденные протоколы ведения пациентов. В этой связи следует подчеркнуть, что даже назначение терапии в соответствии с наиболее современными клиническими рекомендациями не гарантирует успеха при отсутствии взвешенного аналитического подхода, иными словами, клинического мышления, учитывающего особенности каждого конкретного пациента.

Статистика по проценту пациентов, для которых «стандартная» терапия оказывается по разным причинам неэффективной, отличается в зависимости от конкретной патологии, достигая в случае отдельных онкологических заболеваний 70 процентов. При этом во многих случаях причиной наблюдаемых отрицательных результатов лечения является гетерогенность пациентов, обусловленная генетическими различиями в фармакокинетике и, в частности, метаболизме лекарственных средств. Этот фактор лёг в основу фармакогенетики – науки, изучающей полиморфизм отдельных генов, связанных с синтезом белков, принимающих участие в фармакокинетических(процессы, происходящие в ходе метаболизма лекарственного средства)и отчасти фармакодинамических(совокупность эффектов лекарственных средств и их действие на организм) процессов.

После завершения проекта “Геном человека” постепенно начала развиваться фармакогеномика. Это понятие часто считают взаимозаменяемым с фармакогенетикой, но на самом деле это не так. Фармакогеномика — более широкое направление, подразумевающее изучение генетических различий на уровне генома. Вместе с тем, с точки зрения фармакологов, задача перед обоими разделами, одна — выявить группы пациентов, для которых “стандартная” доза препарата является неприемлемой, что вызвано генетическими особенностями, затрагивающими фармакокинетические и фармакодинамические процессы.

**1.2 Классические субпопуляции пациентов и причины разных подходов к лечению.**

Также наибольшую значимость представляют следующие сценарии:

* Низкая активность ферментов метаболизма (медленные метаболизаторы) — в этом случае требуется снижение дозировки во избежание побочных эффектов;
* Высокая активность ферментов метаболизма (быстрые и ультрабыстрые метаболизаторы) и соответственно необходимость повышения дозы для достижения терапевтического эффекта;
* Изначальная неэффективность «стандартной» терапии и необходимость назначения альтернативного лечения (потребность в препаратах второй и третьей линии).

В настоящее время именно фармакогеномика наиболее близка к практическому применению. Доказательством этого является существование порядка 150 фармакогеномных маркеров, которые потенциально могут быть использованы для оптимизации фармакотерапии пациентов. В настоящее время порядка 140 одобренных FDA препаратов содержат информацию о фармакогеномных биомаркерах в различных разделах инструкции по применению, при этом большинство из них направлено на лечение онкологических, в том числе онкогематологических заболеваний [2].

**1.3 Требования к методу фармакогенетического тестирования.**

Для многих препаратов исследование фармакогеномных биомаркеров может стать помощью в выборе оптимальной дозы препарата. Получаемая информация играет две основные роли:

1. Помогает практикующим врачам правильно подбирать препараты и их дозы.
2. Помогает фармацевтическим компаниям создавать новые лекарства — более безопасные и эффективные, с минимизацией побочных эффектов.

Кроме того, фармакогенетическое тестирование позволяет однозначно установить группы пациентов, для которых назначение препаратов изначально является нецелесообразным. Например, установлено, что определённые моноклональные тела эффективны только у носителей не мутировавших, “диких” аллельных вариантов генов различных белков, принимающих участие в патологической активации и прогрессировании колоректального рака.

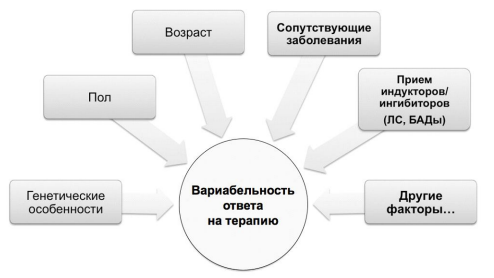
Название “таргетная” этой терапии подчеркивает не только специфическое воздействие на определенный молекулярно-патологический путь, но и на необходимость выделения субпопуляции (группы) пациентов, которая будет являться целевой для конкретного метода лечения и для которых эта терапия будет успешна.

Стоит отметить один из первых относительно успешных примеров внедрения фармакогеномического тестирования, а именно — оптимизацию терапии непрямым антикоагулянтом варфарином (антикоагулянты непрямого действия отличаются тем, что они могут длительно (месяцами, годами) применяться не только в стационарах различного профиля, но и в амбулаторных (домашних) условиях [7]). Варфарин обладает узкой специализацией, риском тяжёлых побочных эффектов (вплоть до летальных). Также доказано, что определённые генетические факторы влияют на большую вариабельность фармакотерапевтического ответа. Всё вышеперечисленное делает его идеальным кандидатом для применения фармакогенетического теста. Чувствительность к непрямым антикоагулянтам довольно часто встречается у больных, это вызывает необходимость подбора доз. Однако в ходе проведения анализов выяснилось, что генетический полиморфизм белков обуславливает только 35% вариативности фармакогенетического ответа. Из-за этого вопрос фармакогенетических тестирований остаётся открытым.

Итак, фармакогенетическое тестирование призвано помочь в подборе терапевтической дозы в зависимости от генного полиморфизма. Однако приведённый выше пример показывает, что для успешного внедрения в клиническую практику, этот метод должен соответствовать ряду критериев, а именно:

* наличие ассоциации между полиформизмом и фармакологическим ответом;
* наличие алгоритма клинической интерпретации получаемой фармакогенетической информации;
* достаточная величина встречаемости изучаемого полиморфизма в популяции;
* доказанные преимущества фармакогенетического подхода к выбору терапии по сравнению с традиционным;
* доступность тестирования для врача и пациента.

**1.4 Персонализация фармакотерапии на фенотипическом уровне на примере астмы.**



Вместе с тем, не следует забывать, что на фармакологический ответ оказывает влияние множество факторов, зачастую не связанных с генетическими особенностями. Преобладание одной из вышеперечисленных групп факторов определяет необходимость персонализации фармакотерапии не только на уровне генотипа, но и на уровне фенотипа.

Хорошим примером является такое заболевание, как бронхиальная астма. Исследования её генетики последних лет показали, что несмотря на выявленную генетическую предрасположенность, генетические маркеры, благодаря определению которых можно было бы говорить о персонализации фармакотерапии данного заболевания, отсутствуют, так как взаимосвязь генов, вовлечённых в её патогенез, чрезвычайно сложна.

Изучение же молекулярных механизмов бронхиальной астмы, с одной стороны углубило представления о ней учёных, но с другой стороны сильнее всё усложнило и, как следствие, от механистического подхода к назначению противоастматической терапии пришлось отказаться. Причиной отсутствия маркеров оказалось высокое влияние “триггеров” астмы — факторов внешней среды, которых существует множество. Для исследования такого рода заболеваний чаще всего исследуют фенотипические характеристики, то есть внешние факторы и патобиохимический механизм, который они вызывают. В настоящее время именно концепция фенотипов и эндотипов признана перспективной для определения критериев персонализированного назначения противоастматической терапии. Европейская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов приводит следующие определения фенотипа, молекулярного фенотипа и эндотипа:

* Фенотип — совокупность характеристик пациента как следствие взаимодействия генотипа и внешней среды.
* Молекулярный фенотип — взаимосвязь патобиологического фенотипа и специфических биомаркеров.
* Эндотип — ключевой молекулярный патобиологический путь, воздействие на который приводит к улучшению клинического исхода.

В настоящее время, согласно рекомендациям Global Initiative for Asthma (GINA), 2017 выделяют следующие фенотипы БА [8]:

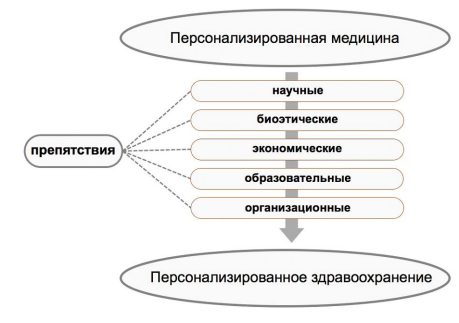
* Аллергическая астма (Ведущим иммунологическим механизмом атопической БА является аллергическая реакция немедленного типа (IgE-опосредованная), а воспаление дыхательных путей носит аллергический характер [9]), ассоциируется с атопией.
* Неаллергическая астма (ассоциирована с назальными полипами, чувствительностью к аспирину; манифестации предшествует респираторная вирусная инфекция).
* БА с поздним началом.
* БА с фиксированным ограничением скорости воздушного потока (за счет ремоделирования стенок бронхов);
* БА на фоне ожирения.
* БА + хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ).

Однако только для некоторых из них обсуждается индивидуальная тактика терапии.

Переход же к молекулярному фенотипированию для персонализации лечения будет зависеть от исследования биомаркеров астмы. Как перспективные рассматриваются следующие биомаркеры: эозинофилы в мокроте, белок периостин, а также оксид азота в выдыхаемом воздухе.

Приведённые примеры показывают, что успешная персонализация терапии произойдёт после того, как будут найдены целевые субпопуляции, для которых персонализация принесёт наибольшую пользу.

**1.5 Препятствия практического внедрения персонализированной модели здравоохранения.**



* Научные: главное препятствие — разрыв между практическим здравоохранением и фундаментальной биомедициной. Также сложность внедрения биомаркеров в клиническую практику: необходимо установление достоверной взаимосвязи между терапевтическим вмешательством, потенциальными биомаркерами и суррогатными конечными точками. Существует ещё одна проблема: референтные диапазоны, значения которых в норме и при патологии часто пересекаются в общей популяции пациентов. Следовательно, персонализация проходит по следующим этапам:
  1. определение соответствия пациента исходным критериям целесообразности персонализированного подхода;
  2. качественный забор необходимого биологического материала для анализа;
  3. высокочувствительный анализ специфичных биомаркеров;
  4. последующая интерпретация полученных данных;
  5. выбор оптимальной стратегии лечения.

Следовательно, направление персонализированной медицины разделяется на два направления: первое касается разработки методов лечения и диагностики, второе — сбора клинических образцов и формирования биобанков для накопления биомедицинских данных о наличии клинически-значимой связи между тем или иным биомаркером и риском развития заболевания.

* Биоэтические: развитие второго направления связано с такими вопросами, как генетическая дискриминация, свободный доступ к генетической информации в обход лечащего врача (пример — история американской компании 23andMe®).
* Экономические: ограниченность ресурсов (тенденция, констатирующая, что переход к персонализированной терапии по определению сопряжен со снижением численности таргетного контингента пациентов и соответственно повышением стоимости прямых затрат).

**Глава 2. Лабораторные методы персонализированной медицины.**

**2.1 Классические методы молекулярной диагностики [11].**

Под молекулярной диагностикой понимается идентификация и изучения нормальных и/или патогенных генетических вариаций в ДНК и/или РНК для постановки диагнозов, классификации заболеваний, мониторинга и корректировки терапии.

После открытия метода ПЦР в 1986 г. на его основе появились лабораторные методы, позволяющие идентифицировать некоторые локальные вариации генов, то есть один или несколько генетических вариантов для одного гена. Т. н. низкопроизводительные ПЦР-методы можно разделить на две группы по охвату данных: сканирующие, которые позволяют идентифицировать любые возможные генетические варианты, и скринирующие, позволяющие идентифицировать известные генетические варианты.

**К скринирующим методам** можно отнести:

* Метод ARMS. Он основан на том, что из-за отсутствия комплементарности между мутировавшим с 3’-конца нуклеотидом праймера и матрицей блокируется ПЦР. Амплификация (процесс копирования участков ДНК, содержащих гены) нормального аллеля достигается за счет праймера полностью комплементарного нормальному аллелю и имеющего несовпадение по 3’-концевому нуклеотиду с мутантным аллелем. И наоборот, амплификация мутантного аллеля идет с полностью комплементарного ему праймера. Дизайн праймеров осуществляется таким образом, чтобы ПЦР продукты с нормального и мутантного аллелей могли быть различимы при электрофорезе (метод, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия [10]).
* Методы гибридизационного анализа, позволяющие идентифицировать специфические нуклеотидные полиморфизмы в сложных смесях с использованием меченой ДНК - зонда для поиска искомой последовательности НК. Например, метод ASO, или аллель-специфическая гибридизация олигонуклеотидовоснован на том, что если хотя бы один из нуклеотидов матрицы не комплементарен зонду, происходит дестабилизация гибридизации. При прямой гибридизации ПЦР-продукты закрепляются на фильтре или мембране. Затем меченые олигонуклеотидные зонды, комплементарные нормальному или мутантному аллелю, гибридизуются на фильтре/мембране. Поскольку в гетеродуплексах имеется нуклеотид, спаренный по ошибке, конструкция таких участков менее устойчива, следовательно, температура денатурации будет ниже, чем в соответствующих им нормальных гибридах. Подобрав температуру денатурации гетеродуплексов, можно с помощью промывки буфером нужной температуры избирательно вымыть с мембраны меченые олигонуклеотиды гетеродуплексов, сохранив олигонуклеотиды правильных гибридов в состоянии, когда они связаны с ДНК блотов (мембран). Прямой метод, как правило, используется, когда требуется протестировать большое количество образцов на несколько мутаций. Для тестирования большего количества мутаций используется обратная гибридизация (дот-блот). При этом зонды закрепляются на мембране/фильтре, а меченые ПЦР-продукты гибридизуются с блотом.

**К сканирующим методам** можно отнести следующие:

* Метод SSCP (Single strand conformation polymorphism или анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма). Он основан на том, что в не денатурирующем геле (разделяемые биологические макромолекулы в процессе электрофореза остаются в исходном состоянии) миграции одноцепочечных фрагментов ДНК зависит не только от их размера, но и от последовательности. Выявлено, что при движении в геле эти фрагменты образуют трёхмерную структуру, соответствующую своей нуклеотидной последовательности, а значит - приобретают уникальную конформацию. Следовательно, при замене даже одного нуклеотида изменения в структуре и виде фрагмента в этом геле будут весьма сильно заметны по своей миграции в геле.
* Гетеродуплексный анализ, или HAD, основан на различной подвижности гомо- и гетеродуплексов ДНК при электрофорезе. При мутации после денатурации, помимо гомодуплексов мутантных и нормальных аллелей, образуется два типа гетеродуплексов между нормальными и мутантными аллелями. И из-за неполной комплементарности гетеродуплексы двигаются в теле геля медленнее, чем гомодуплексы. Определение генотипа осуществляется по электрофоретическому паттерну.

**2.2 Методы, основанные на количественной ПЦР в реальном времени [11].**

В отличие от классической ПЦР, дающей представление о качественном составе и наличии или отсутствии того или иного фрагмента ДНК в исследуемом материале (это происходит из-за того, что детекция результатов происходит после окончания реакции), в количественной ПЦР используются флуоресцентные зонды, и детекция сигнала происходит в реальном времени, по мере накопления продукта. На практике применяются различные методы детекции сигнала и различные “красители” - флуорофоры. Количественная ПЦР получила широкое применение в прикладных и исследовательских областях, в том числе для идентификации генетических вариантов. В этом случае используется одна пара праймеров и два сиквенс-специфичных меченых разными флуорофорами зонда.

Другой способ идентификации основан на использовании аллель-специфичных праймеров: ПЦР проводят с мечеными праймерами, каждый из которых полностью комплементарен только одному из аллелей, при этом вариабельный нуклеотид расположен в 3’-концевой части праймера. Дискриминация аллелей достигается за счет того, что продукт, синтезированный с полностью комплементарного праймера, накапливается в ходе ПЦР быстрее, чем продукт с частично не комплементарного праймера. В случае гомозиготы продукт с одного из праймеров будет регистрироваться раньше другого, в случае гетерозиготы, продукты с обоих праймеров будут регистрироваться одновременно.

**2.3 Микроматричный анализ [11].**

Эта технология появилась в конце 1990-ых годов, быстро вышла из области исследований, связанных с экспрессией генов и поиска биомаркеров, и вошла в практику.

Суть технологии - в гибридизации тестируемой ДНК на матрице из олигонуклеотидов, нанесённых либо на силиконовую, либо на стеклянную подложку. Во время гибридизации с исследуемой ДНК связываются флуоресцентные зонды, образуя (при полной комплементарности зонда и мишени) устойчивые дуплексы. В ходе этих реакций флуоресцентный сигнал считывается с помощью специального сканера. Детекция сигнала осуществляется путем оценки соотношения флуоресценции, тестируемой и контрольной ДНК. Метод позволяет детектировать делеции (исчезновения части), инсерции (вставка другой части), замены, вариации копийности и структурные перестройки. Недостатком является детекция в одном анализе ограниченного числа мутаций, трудоемкий подбор гибридизационных зондов. В современных модификациях (трёхмерный микроматричный анализ), сотни зондов наносятся на микро- и наносферы, а детекция сигнала осуществляется с помощью проточной флуориметрии или флуоресцентного микроскопа. Двухмерный микроматричный анализ чаще используется для выявления и исследования биомаркеров, трёхмерный - для диагностики.

**2.4 Однонуклеотидное удлинение праймеров [11].**

Метод основан на гибридизации специфичного праймера перед исследуемым нуклеотидом. ДНК-полимераза встраивает флуоресцентно меченый дидезоксинуклеотид, который останавливает реакцию и приводит к образованию меченого праймера. Мультиплексирование (Мультиплексная ПЦР **-** метод, с помощью которого различные фрагменты ДНК считываются и используются для обнаружения крупных мутаций в зависимости от их трехмерной формы [16]) достигается за счет использования различных меток в одной реакции. А также за счет разделения праймеров по размеру с использованием гель электрофореза, капиллярного электрофореза или с использованием масс-спектрометрии.

Метод получил распространение для исследования точковых мутаций, а также для изучения сообществ микробов и метилирования ДНК.

**2.5 Капиллярное секвенирование (секвенирование по Сенгеру) [11, 13].**

ДНК клонируется, делится на 4 части, помещается в активную среду с необходимыми для синтеза комплементарной цепи ДНК-полимеразами, нуклеотидами, праймерами и одним нуклеотидом (разным для каждой части) - дидезоксинуклеотидтрифосфатом (ддНТФ), способным образовать водородную связь, но неспособным продолжить цепь. В результате в каждой части синтезируется большое число копий префиксов исследуемого участка ДНК, которые имеют разную длину, но всегда заканчиваются на одну и ту же букву – в зависимости от того, когда в процесс клонирования попадёт ддНТФ, который остановит процесс синтеза на себе.

Например, если взять секвенирование по тимину. Пример исследуемого образца: ААТТГЦГЦЦТАТЦГГГГАГТТ. В итоге получилась бы смесь из префиксов разной длины по встречаемости этого нуклеотида:

ААТ

ААТТ

ААТТГЦГЦЦТ

ААТТГЦГЦЦТАТ

ААТТГЦГЦЦТАТЦГГГГАГТ

ААТТГЦГЦЦТАТЦГГГГАГТТ

Эти варианты разделяются с помощью электрофореза. Считывается последовательность, комплементарная исходной матрице, а количество оснований в ней считается определением массы каждого префикса. В этом и состоит минус такого метода: молекулу массой 700 от молекулы массой 701 отличить труднее, чем молекулу массой 5 - от молекулы массой 6. Статистически, заметно падать качество начинает после 700-800 нуклеотидов, когда в ходе секвенирования по Сенгеру получаются участки (“риды”) длиной около 1000 нуклеотидов. Другой минус заключается в трудности распознания длинного участка цепи из одинаковых нуклеотидов (“...ААААААА…”), так как в таком случае все префиксы с таким нуклеотидом попадут в одну пробирку, некоторые могут не встретиться или наоборот слиться друг с другом и т. д.

Изначально, позиция каждого нуклеотида выявлялась с помощью радиоактивно-меченого праймера методом авторадиографии (основан на выявлении локализации в тканях введенных в них веществ, меченных радиоактивными изотопами. Срезы материала, содержащего меченое вещество, в темноте покрывают фотоэмульсией, которая после определенной экспозиции оказывается засвеченной в участках расположения радиоактивного изотопа [14]). В современных автоматических секвенаторах используются флуоресцентно меченые дидезоксинуклеотиды, а результат секвенирования представляет собой четырёхцветный график, в котором пик каждого цвета соответствует определенному нуклеотиду.

**2.6 Технологии МПС [11, 12].**

Относятся к высокопроизводительным методам идентификации ДНК, основаны на многократном прочтении огромного количества ДНК-клонов (прочтений). В основе детекции сигнала могут лежать различные методы: пиросеквенирование, реакция обрыва цепи с флуоресцентными красителями и т. д. Причиной высокой точности анализа служит многократное прочтение одного и того же фрагмента ДНК. Преимуществом также является возможность тестирования образцов от нескольких пациентов в одной реакции за счёт технологии молекулярного баркодирования образцов (“окрашивание”, присвоение уникального штрих-кода каждой стартовой молекуле для различения их после амплификации. Баркод можно лигировать на ДНК на одном из первых этапов, вставить в праймер для ПЦР, или по технологии template switch, когда с РНК читается комплементарная ДНК, а ревертаза (фермент, катализирующий синтез ДНК на матричной РНК в процессе обратной транскрипции) “перескакивает” на подложку, содержащую баркод, и продолжает синтез ДНК со вставкой этого баркода [15]). Несмотря на преимущества, метод в основном остаётся исследовательским и мало внедрён в клиническую практику из-за отсутствия стандартов исследования образцов, обработки и хранения данных, методик контроля качества и показаний к назначению исследования. Также анализ МПС-данных очень сложен, не имеет выверенных стандартов, и его сложно подогнать под получение воспроизводимых данных, т. к. при разных методах анализа из одних и тех же сырых данных получаются разные результаты. Но даже после получения результатов возникает проблема их интерпретации.

МПС-секвенирование включает три основных этапа: приготовление ДНК-библиотек, пробоподготовку и секвенирование. Сегодня на рынке доминируют две технологии МПС, Illumina и Ion Torrent, принципиальными отличиями которых являются методика пробоподготовки и методика детекции сигнала при секвенировании за счет синтеза. Однако первой широкодоступной технологией секвенирования нового поколения стала платформа Roche 454 Life Sciences.

Roche 454 Life Sciences использует метод пиросеквенирования, основанный на хемилюминесцентных сигналах, которые подают специально модифицированные нуклеотиды, когда соединяются с комплементарным нуклеотидом в прочитываемой нити ДНК.

В случае таргетного секвенирования, библиотека ДНК состоит из считанных одноцепочечных фрагментов ДНК, на наличие которых проверяется исходный образец. Ion Torrent детектирует соединения (ионы), которые выделяются при присоединении нового нуклеотида к нити ДНК. Это позволяет радикально сократить время и стоимость получаемых ридов, хотя процент ошибок становится больше, и больше становится ошибок в фрагментах из повторяющейся одной буквы.

Выделяют четыре основных этапа обработки и анализа МПС-данных: прочтение последовательности, выравнивание прочтений, идентификация вариантов, и интерпретация результатов.

Использование МПС-технологий для идентификации клинически значимых генетических вариантов в многогенных панелях обеспечивает высокую чувствительность тест-системы при относительно невысокой стоимости. Однако детекция множества генетических вариантов в одном исследовании требует автоматизированного подхода к анализу и интерпретации данных.

Важно отметить, что при интерпретации геномных данных не рекомендуется использовать какой-либо один источник, при формировании заключения о клинической значимости того или иного варианта, следует руководствоваться всей доступной информацией о генетическом варианте, а также учитывать дополнительную информацию, такую как цель тестирования, фенотип пациента, этнос, семейную историю, тип наследования заболевания и так далее.

**Выводы: предпринятые шаги и необходимые для дальнейшего развития меры** [17, 18, 19]**.**

Сегодня во многих странах приняты и реализуются планы и стратегии по внедрению персонализированного подхода к лечению

Персонализированная медицина включает в себя несколько стратегических направлений инноваций в медицине, таких как:

* Персонализированная диагностика, включая науку о биомаркерах.
* Персонализированная профилактика.
* Нанотехнологии и наноустройства.
* Персонализированные информационные технологи в медицине. Вычислительные инструменты и трансляционная биоинформатика. Искусственный интеллект.
* Персонализированная фармакология, в том числе персонализированная биологическая терапия.
* Персонализированные клеточные продукты и генные препараты.

Важную роль в развитии этого направления в Российской Федерации сыграли работы академика РАН Е. В. Шляхто, подчеркивающие, что огромные достижения медицинской и биологической науки в настоящее время не находят должного применения в практике врача, и это проблема мировой медицины.

Преодолению расстояния между передовыми достижениями науки и клинической практикой может способствовать т. н. трансляционная медицина - четко сформулированная клиническая задача, решаемая в контакте специалистами фундаментальной биологии, физики и химии и клиницистами, с минимальными затратами и максимально быстро. Е. В. Шляхто была предложена форма кластерного объединения специалистов фундаментальной медицины и клиницистов с приобщением бизнеса, и в Центре Алмазова начато в 2017 году издание журнала «Трансляционная медицина».

Одним из важнейших условий для развития ПМ является валидация и внедрение новых биомаркеров. Процесс создания нового биомаркера включает следующие направления, которые активно развиваются в настоящее время и будут совершенствоваться в будущем:

* Обнаружение маркера и его валидация.
* Оценка предиктивного потенциала и сопоставление с другими маркерами.
* Преклинические и клинические исследования.
* Животные модели.
* Биоинформатическая обработка генетических данных.
* Подходы на основе принципов системной биологии.

С учетом увеличивающегося количества открытых обезличенных баз данных с огромным массивом -омиксных данных о пациентах, подспорьем в разработке и внедрении новых биомаркеров послужит создание соответствующей “экосистемы” вокруг биомаркеров, состоящей из научных и академических центров и лабораторий, фармацевтических и IT-компаний. При этом важнейшей частью всё чаще становятся именно академические центры, т. к. они располагают инфраструктурой и технологиями для проведения исследований по разработке и внедрению биомаркеров. Подобные объединения научно-исследовательских групп могут формироваться вокруг конкретной проблемы. Примером может служить многоцентровая исследовательская инициатива United Europeans по развитию фармакогеномики при лечении рассеянного склероза (UEPHA\*MS), представляющая собой объединение 11 исследовательских групп из 5 стран (Испания, Германия, Франция, Нидерланды, Россия), для изучения биомаркеров эффективности терапии рассеянного склероза [20]. Европейским союзом было выделено финансирование UEPHA\*MS в размере 2,3 млн евро в рамках 7-й рамочной программы поддержки и поощрения исследований в Европейском исследовательском пространстве. Координатором UEPHA\*MS выступил Университет Страны Басков, Испания.

**Заключение.**

В данной работе были рассмотрены предпосылки, история становления парадигмы персонализированной медицины, перспективные направления и проекты в этой области. Также были описаны клинические аспекты применения этой стратегии, доказана необходимость её введения, рассмотрены лабораторные методы прочтения ДНК и трудности, возникающие в ходе введения персонализированного подхода в лечении в клиническую практику.

Хочу поблагодарить Свешникову Анастасию Никитичну за консультирование работы, фактологическую проверку и помощь в поиске источников, а также Ноздрачеву Анну Николаевну за дополнительные объяснения структуры и норм реферата.

**Список литературы:**

Интернет-ресурсы

1. - Дадали Е. Л., Гинтер Е. К., Поляков А. В. Генетическая гетерогенность и некоторые другие проблемы, осложняющие диагностику наследственных болезней нервной системы [Электронный ресурс]

/ Дадали Е. Л., Гинтер Е. К., Поляков А. В. Научная электронная библиотека «КиберЛенинка» - Ссылка для доступа:

[https://cyberleninka.ru/article/n/geneticheskaya-geterogennost-i-nekotorye-drugie-problemy-oslozhnyayuschie-diagnostiku-nasledstvennyh-bolezney-nervnoy-sistemy#:~:text=Под%20генетической%20гетерогенностью%20наследственных%20болезней,клиническим%20проявлениям%20заболевания%20(аллельная%20гетерогенность)](https://cyberleninka.ru/article/n/geneticheskaya-geterogennost-i-nekotorye-drugie-problemy-oslozhnyayuschie-diagnostiku-nasledstvennyh-bolezney-nervnoy-sistemy#:~:text=%D0%9F%D0%BE%D0%B4%20%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B9%20%D0%B3%D0%B5%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%8C%D1%8E%20%D0%BD%D0%B0%D1%81%D0%BB%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D1%85%20%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B5%D0%B9,%D0%BA%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%BC%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%8F%D0%B2%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F%D0%BC%20%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F%20(%D0%B0%D0%BB%D0%BB%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D0%B3%D0%B5%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%8C))

2. - Петров В. И., Шишиморов И. Н., Магницкая О. В., Толкачёв Б. Е. Персонализированная медицина: эволюция методологии и проблемы практического внедрения [Электронный ресурс]

/ Петров В. И., Шишиморов И. Н., Магницкая О. В., Толкачёв Б. Е. Научная электронная библиотека «КиберЛенинка» - Ссылка для доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/personalizirovannaya-meditsina-evolyutsiya-metodologii-i-problemy-prakticheskogo-vnedreniya>

3. - Пузырев В. П. МЕДИЦИНСКАЯ ПАТОГЕНЕТИКА [Электронный ресурс] / Пузырев В. П. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014, Том 18, № 1 <http://medgenetics.ru/UserFile/File/Doc/Publications/2014/Puzyrev-2014-Medgen.pdf>

4. - Определение персонализированной медицины [Электронный ресурс]/ официальный сайт коалиции персонализированной медицины - ссылка для доступа: <https://personalizedmedicinecoalition.org/Home>

5. - National Research Council (US) Committee on a framework for developing a new taxonomy of disease. Toward precision medicine: building a knowledge network for biomedical research and a new taxonomy of disease. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 22536618.

6. - Definition of personalised medicine - Dictionary of Canser Terms NCI [Электронный ресурс]/ официальный сайт национального института рака США - Cсылка для доступа: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/personalized-medicine>

7. -Шилов А.М., Мельник М.В., Святов И.С. Антикоагулянты непрямого действия в терапевтической практике лечения и профилактики венозного тромбоэмболизма. РМЖ. 2006;10:747 [Электронный ресурс]

/ Шилов А.М., Мельник М.В., Святов И.С. - Ссылка для доступа: <https://www.rmj.ru/articles/obshchie-stati/Antikoagulyanty_nepryamogo_deystviya_v_terapevticheskoy_praktike_lecheniya_i_profilaktiki_venoznogo_tromboembolizma/>

8. - Джумабаева С. Э., Джумабаев Э. С., Усманова У. И., Насирдинов М. А. Фенотипы бронхиальной астмы [Электронный ресурс]

/ Джумабаева С. Э., Джумабаев Э. С., Усманова У. И., Насирдинов М. А. Научная электронная библиотека «КиберЛенинка» - Ссылка для доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/fenotipy-bronhialnoy-astmy>

9. - Атопическая бронхиальная астма - клинические рекомендации [Электронный ресурс]

/ Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ) - Ссылка для доступа: <https://medi.ru/docplus/13451.pdf>

10. - ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ОСНОВЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) [Электронный ресурс]/ ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ» - Ссылка для доступа: <https://dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf>

11. - Симакова Т. С. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЧАСТЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА [Электронный ресурс]/ Симакова Т. С. - Ссылка для доступа: <https://med-gen.ru/docs/Disser_Simakova%20T.pdf>

12. - Сафонов Д. Г. Технологии массового параллельного секвенирования в неврологии [Электронный ресурс]

/Сафонов Д. Г., Абрамычева Н. Ю., Алексеев Я. И., Нужный Е. П., Федотова Е. Ю., Иллариошкин С. Н. Научная электронная библиотека «КиберЛенинка» - Ссылка для доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/tehnologii-massovogo-parallelnogo-sekvenirovaniya-v-nevrologii>

13. - Николенко С. Секвенирование геномов для «чайников»

Геномика: постановка задачи и методы секвенирования [Электронный ресурс]/ Николенко С. научно-популярный журнал ПостНаука - Ссылка для доступа: <https://postnauka.ru/longreads/468>   
14. - В. Л. Быков. Цитология и общая гистология (методическое пособие) [Электронный ресурс]/ В. Л. Быков - Ссылка для доступа: [Bykov-\_gistologia\_obschaya-1.pdf](https://drive.google.com/file/d/1Wtq72xKUYcaV5XWWzppDYdBv5hjAzj2V/view?usp=share_link)  
15. - Д. Чудаков. Молекулярное баркодирование, анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов и антител (5:33-8:38) [Электронный ресурс]/ Д. Чудаков - Ссылка для доступа: <https://youtu.be/88LH7Ge0lRo?t=339>   
16. - James B. Mahony, Max A. Chernesky/ Multiplex Polymerase Chain Reaction [Электронный ресурс]/ James B. Mahony, Max A. Chernesky - Ссылка для доступа: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/multiplex-polymerase-chain-reaction>   
17. - Шляхто Е.В., Конради А.О. Персонализированная медицина. История, современное состояние проблемы и перспективы внедрения. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):6-20. [Электронный ресурс] / Шляхто Е.В., Конради А.О. *Российский журнал персонализированной медицины* - Ссылка для доступа: <https://persmed.elpub.ru/jour/article/view/3/3>   
18. - Мокрышева Н.Г., Мельниченко Г.А. Персонализированная медицина — этапы формирования концепции и пути практической ее реализации. Российский журнал персонализированной медицины. 2021;1(1):43-58. [Электронный ресурс] /Мокрышева Н.Г., Мельниченко Г.А. *Российский журнал персонализированной медицины* - Ссылка для доступа: <https://persmed.elpub.ru/jour/article/view/6/8>   
19. - Сычев Д.А., Мирзаев К.Б., Денисенко Н.П., Абдуллаев Ш.П., Гришина Е.А. Фабрика фармакогенетических биомаркеров: как это работает? *Российский журнал персонализированной медицины*. 2021;1(1):33-42. [Электронный ресурс] / Сычев Д.А., Мирзаев К.Б., Денисенко Н.П., Абдуллаев Ш.П., Гришина Е.А. *Российский журнал персонализированной медицины* - Ссылка для доступа: <https://persmed.elpub.ru/jour/article/view/5/6>  
20. - Vandenbroeck K, Comabella M, Tolosa E, et al. United Europeans for development of pharmacogenomics in multiple sclerosis network. Pharmacogenomics. 2009;10(5):885-894. DOI: 10.2217/ pgs.09.33.

Здравствуйте! Катя: 1) Обоснование актуальности работы 1

2)Точность формулировки цели и задач работы 1

4) Степень раскрытия темы / Полнота реализации задач, поставленных в работе 5

6) Уникальность текста не менее 70%, прямые цитаты взяты в кавычки и даны ссылки. 2

Итог: 9 баллов