

Перспективные направления развития омиксных технологий

Аналитическая справка

2018 г.

1. Новые омиксные дисциплины

Генерация омиксных направлений – непрерывный и естественный процесс. Сегодня, помимо традиционных областей можно определенно выделить и такие направления как: гликомика, липидомика, интерактомика (белок-белковые и др. межмолекулярные взаимодействия), интерферомика (взаимодействие РНК) и множество других. Эти дисциплины находятся на ранней стадии развития, и даже в случае, если отдельные исследовательские группы изучают какое-либо явление на протяжении длительного времени, сейчас, учитывая трансформацию представлений о живых системах, наступил удачный момент для переосмысления полученных ранее данных в контексте системной биологии. Ниже мы остановимся на нескольких наиболее интересных омиксных направлениях.

1.1. Флаксомика

Исследования динамики потоков и концентраций веществ во времени обладают столь специфической методической базой и столь существенным влиянием на развитие области системной биологии, что они были выделены в отдельную дисциплину: флаксомику (*fluxomics*). В то время как метаболомика описывает лишь распределение метаболитов в биологическом образце, истинный клеточный фенотип может быть описан лишь в виде совокупности метаболических потоков.

Отдельно стоит упомянуть пространственную флаксомику – оценку балансового потока во внутриклеточных компартментах. Как известно, метаболизм эукариот, в отличие от микробного, распределен по внутриклеточным компартментам. Ряд исследований показал: изменение интенсивности или направленности потоков между компартментами приводит к активации канцерогенных механизмов. Измерение метаболома каждой клеточной органеллы в отдельности представляется одним из самых передовых направлений метаболомики. Single compartment анализ несомненно придет на смену поколению single cell исследований с развитием новых технологий.

1.2. Сплайсомика

Такое название получило направление по изучению совокупности вариантов альтернативного сплайсинга в клетке. Существует ряд пилотных исследований, в которых

показано: сплайсом (*spliceome*) претерпевает значительные изменения при различных патологических состояниях, например, при канцерогенезе.

Все больше данных появляется о специфичности протеома мышечных клеток и о действующих в транспозиции регуляторных факторах. Существует информация о том, что мышечный сплайсом может меняться под воздействием внешних факторов, что может найти применение в спортивной медицине [Nakka et al., 2018].

Предполагается, что низкая частота некоторых сплайс-вариантов белков эволюционно закреплена для определенных типов клеток или физиологических событий. Вероятно, некоторые формы белка показывают высокую экспрессию только при столкновении с определенными факторами окружающей среды, поскольку их специфические функции становятся необходимыми только в этих редких случаях [Younis et al., 2013]. Таким образом, при исследовании необходимо не просто выявлять редкие сплайсоформы, но и соответствующие им состояния организма.

Метаболом и протеом клетки изучаются в подавляющем большинстве случаев в биологических жидкостях: крови, мочи, слюне – то есть, в среднем по организму. Однако ткане- и нозоспецифичность сплайс-вариантов по-прежнему нуждается в аккуратном исследовании. Детекция и подробное картирование специфических белков или метаболитов – одна из самых актуальных задач протеомики, имеющая огромные перспективы для применения в клинике в самом ближайшем будущем. Проводимые клинические исследования протеомных панелей, как правило, заканчиваются неудачно, вероятно, именно в связи с отсутствием поправки на профиль конкретного заболевания или ткани.

На сегодняшний день стандартизированных пайплайнов для детекции аномальных сплайс-вариантов не существует. Современные протеомные технологии обладают ограниченной чувствительностью и не способны к детекции белков, концентрации которых в плазме ниже пг/мл. Более же глубокие слои протеома плазмы могут содержать широкий спектр специфических биомаркеров, в связи с чем становится очевидной необходимость разработки ультрачувствительных технологий.

1.3. Пептидомика

Благодаря множественным альтернативным промоторам, сплайсингу и пост-трансляционным модификациям протеом содержит более 1 млн белков и пептидов. Термин «пептидом» был впервые введен в научной литературе в 2001 году и описывает совокупную низкомолекулярную фракцию протеома.

Пептиды представляют собой пока еще мало изученную область среди остальных омиков. Однако несомненно: в ближайшем будущем ситуация изменится, в первую очередь следуя за потребностями фарминдустрии. В то время как сегодня большинство лекарственных средств представляют собой малые молекулы, потенциальный пул этого

класса веществ практически истощен. Пептидом же – гораздо более разнообразная система, к тому же пептидные препараты начали появляться на рынке всего несколько лет назад. Пептиды обладают гораздо более высокой субстратной специфичностью, быстрее метаболизируются, что означает низкую токсичность и меньшее количество побочных эффектов. В то же время количество эндогенных пептидов в организме человека намного больше по сравнению с эндогенными малыми молекулами, а значит, потенциальный спектр их биологических активностей гораздо шире.

1.4. РНКомика

Некодирующая фракция РНК по-прежнему остается «белым пятном» транскриптома. Несмотря на тысячи описанных молекул базы данных ежегодно пополняются все новыми находками. При этом исследователи чаще всего ограничиваются описательным характером публикации, в то время как физиологическая роль выявленных молекул остается неизвестной.

Новый и относительно мало изученный класс длинных некодирующих РНК – циклические РНК (сcircular RNAs, circRNAs). Каждая молекула соединена в цикл ковалентной связью, не обладая при этом 5'-3' полярностью и поли(А)-хвостом. Этот тип РНК обнаружен преимущественно в клетках млекопитающих в виде фракции молекул, устойчивых к обработке РНКазой R (разрушает только линейные структуры). Циклические РНК кодируются ортологичными генами различных организмов, им свойственна специфическая экспрессия по отношению к ткани и стадии развития организма. На данный момент считается, что они корректируют уровень экспрессии генов на транскрипционном или пост-транскрипционном уровне путем связывания с микроРНК и другими регуляторными молекулами и ингибирования их функции. Также появляется все больше свидетельств об участии циклических РНК в развитии заболеваний, в частности, атеросклероза, нейродегенерации, остеоартрита и диабета. При некоторых типах рака (колоректальный, гепатоцеллюлярная карцинома и др.) наблюдается аномальная экспрессия этих РНК. Учитывая растущее число подобных сообщений в научной литературе, циркулирующие РНК можно рассматривать как интересное направление для изучения эпигенетической регуляции генома в целом, как новый класс диагностических/прогностических биомаркеров, и даже в качестве перспективных фармакотерапевтических мишеней.

1.5. Эпитранскриптомика

В дополнение к достаточно хорошо изученным эпигенетическим модификациям ДНК и пост транскрипционным модификациям белков, информация об обратимом метилировании РНК лишь недавно стало появляться среди научных статей. Открытие этого явления стало основой для третьей волны эпигенетических исследований, получившей

название эпитранскриптомика. Пока известно чуть более 100 вариантов химической модификации РНК, среди которых метилирование является основным.

5-метилцитозин (М5Ц) – распространенная модификация в транскриптоме эукариот, к спектру ее биологических действий относится регуляция ответа на стресс, клеточной дифференцировки и канцерогенеза. Недостаточность М5Ц в тРНК приводит к их деградации эндонуклеазами, что напрямую препятствует трансляции белка. Значение М5Ц в других типах РНК для физиологии клетки пока неясно. Существуют данные об ассоциации аутоиммунных нарушений, нейродегенеративных и онкозаболеваний как с повышенной, так и со сниженной функцией РНК-метилирующих ферментов.

Для прокариот мутации в РНК-метилирующих ферментах не являются критичными для выживания, и более того, в некоторых случаях – благоприятны. Наибольший клинический интерес представляет возрастание антибиотикорезистентности бактерий при утрате функции метилирующего белка в результате мутации (V.Stojković et al., 2016).

1.6. 3D-геномика

Незаслуженно обойденное вниманием ученых направление. Максимум, описываемый в современных научных статьях – взаимное расположение двух-трех отдельных локусов генома, возможно описание шаперонных белков, ассоциированных с исследуемыми локусами. Следует признать, что на сегодняшний день у нас нет ни малейшего представления о том, как устроена трехмерная структура генома в ядре. Между тем, это знание необходимо для понимания принципов эпигенетической регуляции и изменения паттернов генной экспрессии при физиологических и патологических изменениях.

2. Исследования «темной материи»

Темная материя – составляющая с неизвестной функцией и/или структурой – выявляется при биоинформатическом анализе любых омиксных данных. Содержание темной материи варьируется: в микробиоме человека обычно удается определить не более 20% видов бактерий, в то время как в случае генома функции не установлены более чем для 70% его длины. Исследования по масс-спектрометрическому анализу метаболома в среднем содержат информацию о ~100 выявленных метаболитах. Еще в 2015 году da Silva и соавт. была приведена неутешительная статистика: в некоторых научных статьях идентифицируется лишь 1,8% от общей массы полученных данных.

Протеомика – наименее развитая область среди всех омиксов с точки зрения изучения темной материи. По сравнению с секвенированием, протеомные технологии гораздо менее точны и производительны, а по сравнению с метаболомом протеомный состав клетки значительно более разнообразен и сложнее организован. Проект «протеом человека» ведется в десятках стран, однако, в отличие от транскриптома или метаболома,

все еще находится на ранней стадии развития. Белковые пути (pathways) гораздо более многомерны и гораздо менее изучены по сравнению с генными сетями и даже по сравнению с эпигенетической регуляцией генных сетей.

Среди клиницистов распространено мнение: не обязательно знать, что именно представляет из себя детектируемая молекула, ни структурно, ни функционально; главное в практическом использовании – статистически стабильная ассоциация её с определенной фенотипической чертой. Это в корне неверный подход, приводящий к созданию бессмысленных наборов биомаркеров, которые при небольшом изменении системы теряют клиническую значимость.

Только глубокое понимание природы метаболических путей, в которые вовлечена биомаркерная молекула, а также генных сетей, ответственных за продукцию участников этого метаболического пути, то есть, установление места биомаркера в метаболической системе клетки, может служить основой для качественной диагностики. Профессор Robert Hall, почетный член международного общества метаболомики считает, что именно интеграция в уже известные системы новых биомаркеров, а также переосмысление уже известных биомаркеров в контексте системной биологии станут основными задачами исследователей в области метаболомики в ближайшие 5–10 лет.

Даже при установлении структуры изменяющегося компонента темной материи остается проблема биологической интерпретация получаемых различий. Перечень изменяющихся компонентов системы сам по себе неинформативен, поскольку не дает информации о физиологическом значении изменений. Для решения этой задачи необходимо развитие аналитических инструментов по исследованию молекулярных внутриклеточных путей. На сегодняшний день все такие программы ценны скорее тем, что представляют полную и аккуратную аннотацию имеющихся литературных или экспериментальных данных. Максимальный функционал таких широко известных средств как Pathway studio (Elsevier) или Metacore (Clarivate Analytics) – выделение цветом метаболитов с изменяющимися экспериментальными значениями на уже готовых метаболических путях. То есть, эти инструменты представляют исключительно описательные функции, в то время как содержательная интерпретация по-прежнему производится исследователями вручную. Потенциальным решением здесь может служить построение метаболической модели клетки, органа и, в конце концов, организма.

3. Математическое моделирование метаболизма

Первым главным препятствием на пути построения качественной математической динамической модели метаболизма является малое количество метаболитов, которые можно измерить экспериментально. «Бутылочным горлышком» при математическом моделировании живых систем являются именно эмпирически полученные данные. Высокий уровень шума (имеется в виду многочисленность несущественных данных) и неаккуратность получаемых результатов (низкая воспроизводимость и зависимость от

прибора или протокола анализа) – с этим невозможно справиться ни статистически, ни даже при использовании сложных математических алгоритмов вроде искусственного интеллекта. Несмотря на популярность «больших» данных, реальность такова, что даже если данные единообразно аннотированы в одну базу их нельзя анализировать совместно. Строго говоря данные ЯМР-спектроскопии, полученные одним исследователем на одном и том же приборе, но в разных запусках нуждаются в столь существенной статистической нормировке, что сохраняются лишь грубые различия, в то время как важнейшие нюансы будут утеряны.

Для преодоления этой проблемы необходимо развивать инструменты работы с мультимодальными данными. Взаимная интеграция геномных, транскриптомных и протеомных данных позволит верифицировать находки и объяснить регистрируемые процессы с точки зрения центральной догмы молекулярной биологии. К сожалению, таких аналитических инструментов на сегодняшний день не существует, сопоставление разных типов данных и их интерпретация производится вручную или с помощью *in house* биоинформатических пайплайнов. Более того, для развития этой сферы необходимо, в первую очередь, создавать технологические решения по единовременному анализу генома, транскриптома и т. п. в одном образце.

Вторая существенная проблема – отсутствие систем экспериментальной проверки гипотез, генерируемых математическими моделями. Таргетированная метаболомика и протеомика обладает весьма ограниченными возможностями детекции, в связи с чем развитие этой области будет определено представлять интерес для исследователей в сфере синтетической биологии для предсказания эффектов генной модификации или метаболических особенностей *de novo* созданных организмов.

Christophe Junot, глава национальной французской инфраструктуры в области метаболомики MetaboHUB в своем интервью журналу международного общества метаболомики утверждает, что существующие математические модели метаболизма клетки не способны объяснить экспериментально получаемые данные в связи с тем, что не все метаболические пути на сегодняшний день открыты и описаны. По мнению ученого, тканеспецифичность многих процессов вносит существенные коррективы в регистрируемые концентрации метаболитов, а при наличии у человека какого-либо заболевания возможна активация минорных путей или появление нестандартных взаимопревращений веществ.

Сегодня наиболее популярной математической моделью метаболизма является, безусловно, *flux balance*. Однако, у анализа метаболических потоков есть один существенный недостаток: моделирование происходит с условием стабильности системы. В то же время не секрет, что биологические системы в основном подвержены ритмическим или вызванным колебаниям. Следовательно, *flux-balance* принципиально не способен описать работу, например, нервной клетки. Более того, поскольку анализ потоков не учитывает реальные концентрации метаболитов, вполне вероятно, что некоторые решения этой системы не будут вписываться в возможные физиологические рамки процессов.

Важными преимуществами анализа метаболических потоков является доступность такого моделирования без необходимости покупки дорогостоящих высокопроизводительных компьютеров, а также возможность получать достоверные результаты без учета активностей ферментов и их кинетики.

Создание альтернативных математических метаболических моделей, а также экспериментальных моделей для их валидации – важное направление развития, которое несомненно потребует использования широчайшего спектра омиксных технологий. Поскольку метаболические потоки регулируются не только активностью тех или иных ферментов, но и, что более существенно, уровнем экспрессии генов, кодирующих эти ферменты, интеграция транскриптомных данных – крайне важный шаг для получения новой генерации математических моделей метаболических сетей.

4. Новые технологические решения

Традиционными методами анализа метаболома являются газовая или жидкостная хроматография с детекцией масс-спектрометрией, а также ЯМР-спектроскопия. У каждого из этих подходов есть свои ограничения. Результаты, полученные с помощью ЯМР, считаются более точными и воспроизводимыми, а время анализа одного образца может составлять всего десять минут. Однако чувствительность этого метода не очень высока: метаболиты, концентрация которых ниже ~10 мкМ, не могут быть детектированы, а значит, невозможна и работа с метаболомом единичных клеток. Хромато-масс-спектрометрические (ХМС) методы, напротив, позволяют работать даже с очень небольшими количествами веществ, однако для достижения высокой точности необходимо существенное увеличение времени анализа.

Одна из новейших разработок в области ХМС – многомерная хроматография (наиболее доступным её вариантом является двумерная жидкостная хроматография). Этот подход позволяет увеличить максимальную производительность и разделительную способность. Автоматизированная многомерная хроматография, как жидкостная, так и газовая, подразумевает параллельную работу двух или более колонок с независимой детекцией. Высокая точность достигается анализом последовательной серии образцов, сначала поступающих в одну колонку (первое измерение), а затем во вторую (второе измерение) и так далее. Получаемые данные визуализируются в двух- или трехмерном пространстве. Четкость разделения при этом намного превышает стандарты одномерных ХМС систем.

Такие недавние разработки как жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC) или *and* водная нормально-фазовая хроматография (ANP), значительно повысили возможный единовременный охват метаболитов во время анализа.

Существуют новые решения и для ЯМР метаболомики. Динамическая ядерная поляризация – недавно появившийся метод детекции, вполне вероятно, способен решить проблему низкой чувствительности ЯМР-спектроскопии. Эта технология основана на том,

что в заданном магнитном поле за счет более высокого гиромагнитного отношения у неспаренных электронов спиновая поляризация намного сильнее по сравнению с активным ядром в ЯМР технологии (~ 28,000 МГц/Т по сравнению с ~660 у ¹H).

Использование альтернативных ядер – перспективный подход в ЯМР-спектроскопии. Достаточно много исследований посвящено анализу эффективности ¹³C и ³¹P. Флуорин ¹⁹F обладает высоким гиромагнитным отношением, делая измерения на его основе сравнимыми по точности с ¹H ЯМР.

Азотный ЯМР также показывает хорошие результаты, однако в данном случае существенным ограничением служит низкое содержание азота в белках и метаболитах. Например, азотная группа удаляется из аминокислот трансаминазами перед вступлением их в цикл трикарбоновых кислот. Возможно, позднее этот тип ЯМР найдет применение в более узкой области метаболомики, например, будет использован для анализа конкретных азотсодержащих маркеров. Здесь следует подчеркнуть, что несмотря на тенденцию к синтезу технологий и расширению спектра получаемых данных из одного образца для целей фундаментальной науки, будущее клинической практики – за таргетными решениями. Микрочипы с панелями для генов или их транскриптов представляются более экономически целесообразным решением по сравнению с полногеномным или транскриптомным секвенированием¹. В то время как ХМС остается центральным звеном для выявления новых биомаркеров, при разработке устройств point of care основная ставка делается на белковые чипы. Высока вероятность, что именно для рутинного клинического анализа наиболее адекватным решением станет использование узкоспециального азотного ЯМР-спектрометра.

Для идентификации неизвестных компонентов смеси существует три основных подхода. Первый предполагает использование только масс-спектрометрических средств. При этом спектр фрагментации изолированного неизвестного метаболита сравнивается с библиотекой спектров всех кандидатных изомерных структур, в результате чего выявляется наилучшее соответствие. Второй подход полагается на использование лишь ЯМР: экспериментально полученные химические сдвиги неизвестных метаболитов последовательно сравниваются с рассчитанными квантовыми сдвигами различных химических структур. Несомненно, эти методы по отдельности обладают весьма ограниченной предсказательной силой. В попытке преодолеть эти ограничения началась разработка гибридных ЯМР-ХМС технологий.

Интересным подходом является комбинация ЯМР и tandemной масс-спектрометрии. Традиционно, определение неизвестного метаболита осуществляется путем изоляции молекулы из экстракта в количестве, достаточном для установления его трехмерной структуры (с помощью ЯМР, рентгена, кругового дихроизма и пр.). Несмотря на эффективность такого подхода, полное фракционирование – крайне трудоемкий и

¹ Хотя и данное утверждение не может претендовать на абсолютность, ведь к практическому использованию предлагаются сейчас такие биоинформатические решения, как анализ на основе единичного прочтения генома

времязатратный процесс. Более того, получить достаточное для анализа количество малораспространенного метаболита часто бывает невозможно. Одним из наиболее успешных результатов можно считать методику ISEL (Integrated Structure ELucidation by NMR/MS2). Это платформа, использующая комбинацию *in silico* предсказаний как тандемной масс-спектрометрии, так и ЯМР. Разработчики предлагают использовать этот инструмент совместно с экспериментальными данными ЯМР и жидкостной хроматографии высокого разрешения, однако, вполне вероятно, при использовании двумерной хроматографии возможно получение еще более точных результатов.

Еще одна возможная альтернатива – рамановская спектроскопия. Пробоподготовка в данном случае минимальна, как и время самого анализа. Раман-спектроскопию используют для детекции опасных веществ, например, для выявления боевых отравляющих веществ или при проверке безопасности в аэропорту - то есть, в областях, где важна предельная точность анализа и надежность данных. Этот метод может найти применение и в анализе биологических систем. Его существенным ограничением является низкая чувствительность, однако недавняя разработка Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) позволяет существенно (более чем в 100 раз) усилить сигнал Раман-активных молекул с помощью золотых или серебряных наночастиц. Теоретически, эта разработка может обеспечить детекцию с разрешением до единичной молекулы.

Рамановская спектроскопия может поспособствовать прогрессу и при исследовании хиральности биологических молекул. На данный момент хиральность – незаслуженно обделенная вниманием область метабомики. Условно считается, что в живых системах преобладает одна хиральная форма, как например, D-сахара или L-аминокислоты. Тем не менее, поддающиеся количественной оценке D-аминокислоты у млекопитающих могут стать содержательными биомаркерами. Еще в 2000 году были получены данные об ассоциации D-серина с дисфункцией NMDA-рецепторов [Snyder et al., 2000]. Во многом, отсутствие информации о подобных ассоциациях связано с трудоемкостью проведения анализа на хиральность с помощью хроматографии или электрофореза. Метод рамановских спектров оптической активности комбинационного рассеяния [Parchaňský et al., 2014] могут существенно расширить горизонты знаний в этой области.

Изучение метаболических потоков на уровне внутриклеточных органелл производится с помощью изотопно-модифицированных нутриентов и последующим отслеживанием потоков меток. Такой метод носит название metabolic flux analysis (MFA). Он использует стехиометрические модели метаболизма, ЯМР и изотопную масс-спектрометрию с высоким разрешением, позволяющую отслеживать даже перемещения функциональных групп от одной молекулы к другой. Подвид MFA – Thermodynamics-Based Metabolic Flux Analysis – использует также термодинамические параметры клетки.

В области геномики можно выделить две новых технологии:

Pacific biosciences (PacBio) – новая для российского рынка технология секвенирования. Принципиальное её отличие от Illumina заключается в средней длине

чтений (более 10кб). Это существенно при сборке генома, ведь существующая консенсусная последовательность человеческого генома пересматривается каждые несколько лет именно в связи с небольшим размером чтений. Для анализа структурных вариаций, копийности и повторов технология PacBio гораздо более предпочтительна.

Oxford nanopore technologies (ONT) – единственная из разработок секвенаторов четвертого поколения, преодолевшая стадию прототипа. Эта инновационная технология непрерывного чтения полного генома (а не коротких его фрагментов как в случае обычного NGS) открывает новые горизонты для исследований в этой области. Ограничением служит этап загрузки молекулы в анализатор, на текущий момент максимальная длина чтения составляет 900 кб, однако теоретически это ограничение может быть снято усовершенствованием этапа пробоподготовки. В перспективе нескольких ближайших лет ONT может занять лидирующие позиции на рынке за счет небольшого размера и мобильности своих приборов, а также за счет принципиального удешевления полногеномного секвенирования.

Транскриптомика всё более тяготеет к анализу единичных клеток и *in situ* секвенированию, что будет более подробно рассмотрено в разделе «пространственное профилирование». Следует отметить, что в современных исследованиях экспериментаторы предпочитают измерять экспрессию целевых генов, а при интерпретации результатов прибегать к допущению, что данные по экспрессии отражают реальное количественное содержание белка в клетке/ткани/организме. На самом деле, такое допущение имеет под собой крайне сомнительные эмпирические основания: до сих пор не существует ни одной полноценной методической работы, в которой бы сравнивались профили транскриптов и белков одного образца. Количество посттранскрипционных факторов, которые могут повлиять на судьбу мРНК, огромно. Начиная с нкРНК и заканчивая посттрансляционными модификациями и пространственной организацией компартментов клетки – сотни параметров определяют будет ли белок синтезирован в принципе, удастся ли ему принять физиологически активную трехмерную структуру или связаться с другими белками в функциональный агрегат, и в конце концов, достигнет ли этот белок целевой локализации в клетке, где он и выполнит свое предназначение. Прямое измерения содержания белков в клетке, и тем более во внутриклеточных компартментах – основная точка роста протеомики в ближайшие годы.

Не вызывает сомнений, что будущее омиксных технологий - за прямой детекцией биомолекул и минимизацией пробоподготовки. Научное сообщество однозначно в своем консенсусе: более всего систематические ошибки в данные вносит именно преаналитический этап.

4.1. Межклассовое мультиплексирование

Одним из наиболее очевидных направлений развития омиксных технологий является возможность исследования нескольких уровней организации живых систем. В

виду имеется, конечно же, идея *универсального анализатора*, позволяющего получить геномные, транскриптомные, протеомные и др. данные одновременно из одного образца.

Концепция такого совмещенного анализа, хоть и достаточно очевидна с точки зрения ученого как пользователя научного оборудования, отнюдь не является “low hanging fruit” для технологических компаний. Проблема заключается, безусловно, в принципиальных различиях пробоподготовки для каждого из омиксных анализов. Как правило, для получения информации об определенном типе биополимеров клетки требуется удалить из образца все остальные классы макромолекул. А для проведения метаболомного анализа придется разрушить и элиминировать все высокомолекулярные субстанции. Существующие технологические решения для глубокого анализа белковой и метаболомной фракции клетки не поддаются совмещению с другими типами анализа.

Попытки осуществить единовременный анализ ДНК и РНК ранее предпринимались с помощью оптимизации протоколов пробоподготовки и экстракции [van der Meer et al., 2013]. Примерами наиболее успешных разработок являются метод SIDR [Han et al., 2018] для одновременного выделения геномной ДНК и тотальной РНК из единичных клеток и прибор Gel-seq, с помощью которого возможна параллельная подготовка библиотек разных НК для последующего секвенирования. В некоторых публикациях описаны методы пробоподготовки с целью дальнейшего анализа метилирования ДНК и генной экспрессии [Umemori et al., 2016]. Также распространенным подходом является комбинация FISH (флуоресцентной гибридизации in situ) ДНК, РНК и иногда – белков [Puray-Chavez et al., 2017], который, впрочем, относится к области цитогенетики.

Наиболее перспективными же следует считать подходы, позволяющие одновременно *детектировать* различные типы макромолекул. К примеру, компанией Asuragen еще несколько лет назад была анонсирована технология QuantideX®, предоставляющая возможность мультиплексного определения ДНК и РНК онкомаркеров в одном образце. Для коммерческого использования, однако, компания пока что предоставляет только наборы для определения либо ДНК, либо РНК. Еще одной перспективной разработкой является 3D biology от Nanostring. Их Vantage 3D Assays позволяют одновременно провести генотипирование образца, профиль экспрессии нескольких сотен генов и десятков белков. Предназначены эти панели также для исследований в области онкологии. Несомненно, количество технологических решений для мультиплексного анализа ДНК, РНК, белков, микромолекул и т.д. будет расти с каждым годом. На текущий момент эта ниша практически не заполнена.

4.2. Пространственное профилирование

Актуален и другой уровень синтеза технологий: например, объединение омиксных и клеточных подходов. В авангарде научных разработок микроомиксы, т.е., анализ небольшой группы или вовсе единичных клеток.

Гетерогенность клеток внутри одной ткани или клеточной линии – серьезная проблема молекулярных исследований, снижающая точность и воспроизводимость результатов, препятствующая их трансляции в клиническую практику. Как правило, омиксное профилирование производится для групп клеток: нескольких сотен микролитров крови, нескольких нанограмм биопсийного материала и т.п. Получаемые данные отражают усредненные показатели для данной группы клеток. При повторном анализе того же, на первый взгляд, биоматериала изменение таких динамических параметров как уровень экспрессии или метилирования гена может изменяться на порядки.

С такой проблемой столкнулась, к примеру, лаборатория репарации и регенерации тканей в Институте регенеративной медицины МГУ. В своем докладе на конференции Российской ассоциации биобанков и специалистов по биобанкированию А. Ефименко, руководитель лаборатории, рассказала, что несмотря на строгое соблюдение протоколов забора опухолевого материала у пациентов и единообразия в последующем культивировании клеточных линий, клетки внутри одной линии серьезно различаются набором мембранных маркеров. Более того, даже клетки с одинаковым набором поверхностных рецепторов демонстрировали различный профиль генной экспрессии, причем эти различия не могут быть объяснены различными стадиями клеточного цикла. Эти данные можно было бы отнести к простым лабораторным находкам, если бы не существенные различия в транскрипционной активности генов, ассоциированных с радио- и хеморезистентностью опухолей.

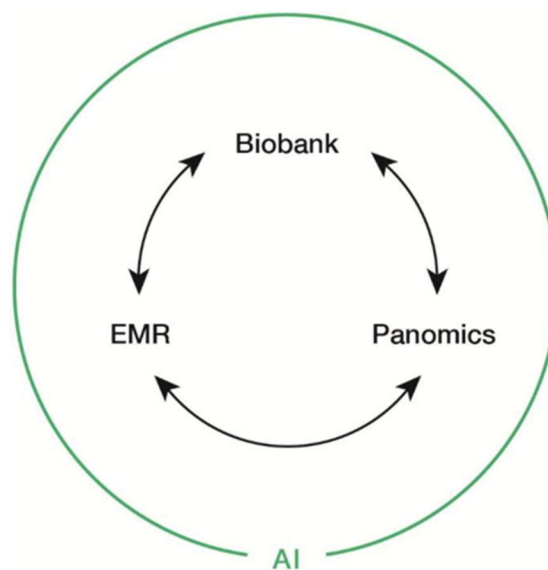
Гетерогенность микроокружения злокачественных опухолей описана достаточно давно и каждый год появляются все новые свидетельства о клинической значимости их трехмерной структуры. Подтверждением служит и возросшая популярность сфероидных клеточных моделей для исследований в области онкологии [Nath et al., 2017], [Watters et al., 2018]. Применение омиксных технологий к единичной клетке в данной конъюнктуре представляется естественным. Британское общество Cancer Research UK провозгласило картирование молекулярного и клеточного микроокружения опухоли одним из основных направлений омиксных исследований.

Серьезный прорыв в этом направлении совершила уже упоминавшаяся ранее компания Nanostring, представив в 2019 г. анализатор GeoMx для пространственного профилирования парафинированных тканевых срезов. Ультраточувствительный иммунофлуоресцентный микроскоп позволяет установить морфологическую структуру исследуемого среза. Затем же, с помощью микрокапилляра можно отделить целевой регион вплоть до единичной клетки и далее провести анализ содержания РНК и/или белков в образце. По сравнению с клеточными сортерами, традиционно используемых для отбора единичных клеток, представленная технология обладает существенными преимуществами: более высокой точностью, производительностью, надежностью, удобством использования. Не вызывает сомнения, что за подобными гибридными технологическими решениями будущее омиксных дисциплин.

4.3. Новое поколение биобанков

Несмотря на создание в 2017 году первой Национальной ассоциации биобанков (НАСБио), к апрелю 2019 года лишь один российский биобанк аккредитован международным обществом ISBER, а по международным критериям менеджмента качества (ISO 9001/ 17025) аккредитация ожидается лишь в перспективе ближайших 1-2 лет.

Тем временем, мировой уровень биобанкирования непрерывно растет. Определившись со стандартами оборудования и процедур, ведущие западные репозитории объявили о переходе от рутинного сбора и хранения биоматериала (sample-centric strategy) к сбору и хранению омиксных аннотаций (data-centric strategy).



Одной из серьезных, не решенных пока задач, является ассоциация омиксных данных биообразца с клинической информацией о доноре. Оцифровка клинических данных в принципе представляет огромное препятствие для развития медицины ЗП (4П, 5П). Однако уже сейчас понятно, что без интеграции фенотипических характеристик информативность молекулярной составляющей крайне ограничена.

Клиническая имплементация мультимодальных данных получила название «паномиксы». Предлагаемая схема интеграции паномиксов в клиническую практику приведена на рисунке справа. Двумя другими необходимыми звеньями являются система электронных историй болезни (EMR) и оснащенные системой искусственного интеллекта биобанки.

Проведение геномных, протеомных и других подобных анализов – дорогостоящая процедура. На текущий момент российские биобанки финансово истощены закупкой криосистем, способных вместить многие тысячи образцов, высокопроизводительных секвенаторов, логистическими расходами на сбор пилотных коллекций, затратами на обучение сотрудников. Запланированные проекты в случае сугубо научной ориентации –

заморожены. Продолжающиеся исследования финансируются фармкомпаниями или проводятся в коллаборации с другими геномными центрами. Таким образом, создание уникальных биокolleкций, ассоциированных с омиксными данными, сегодня видится перспективным направлением сотрудничества с биобанками России: как для проведения фундаментальных исследований, так и для возможной коммерциализации разработок.

5. Синтетические технологии

Прогресс в области омиксных технологий способствует развитию и смежных областей. Благодаря высокопроизводительным секвенаторам и ВЭЖХ появилась возможность практически в режиме реального времени анализировать работу синтетических биоинженерных структур. Создание работающих метаболических моделей, о которых шла речь в разделе 3, позволит решить важную задачу и синтетической биологии: возможность предиктивной метаболической инженерии. Безусловно, это направление будет крайне востребовано как в ближайшем будущем, так и в долгосрочной перспективе.

Синтетическая биология переживает технологический взрыв уже второе десятилетие (см. рисунок ниже). Сегодня производство модифицированной синтетическими генами бактерии представляет собой стандартную рутинную процедуру в рамках деятельности биоинженерной лаборатории. Технически осуществимо и неоднократно продемонстрировано на практике создание полностью синтетических одноклеточных организмов. Однако при манипуляции более сложными живыми системами, например, при генной модификации растений, предсказать все эффекты инвазии крайне затруднительно в связи с недостаточным пониманием метаболических процессов клетки.

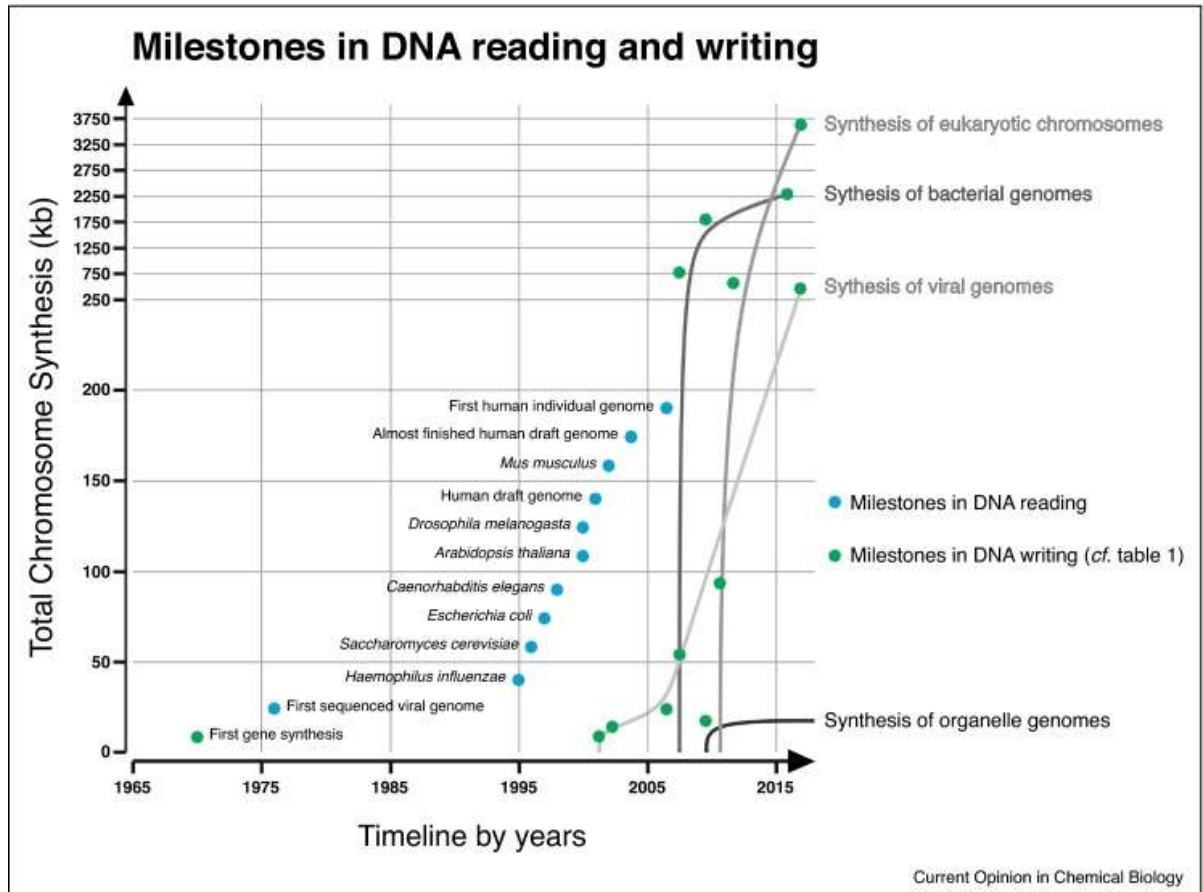
Уже сейчас технически возможно создать полностью искусственную хромосому размером до 6,1 Мб. Стоимость такой процедуры составляет около \$425 000, учитывая рыночную цену в 7 центов за неклональный ДНК-фрагмент в 1,8 Мб. Синтез гаплоидного человеческого генома будет составлять примерно \$45 000 000. Безусловно, с развитием синтетических технологий, стоимость будет снижаться [Schindler et al., 2018].

Наиболее реалистичной задачей в настоящее время может считаться создание синтетических геномов митохондрий человека или пластид растений. Примеры подобных работ уже существуют: в 2010 году Gibson и соавт. удалось получить полностью синтетический митохондриальный геном мыши, таким образом получив proof of principle.

Полных синтетических геномов эукариот по-прежнему не получено. Наиболее близок к этому рубежу проект Sc2.0 (www.syntheticyeast.org), ставящий целью синтезировать геном дрожжей.

Возможность полноценного синтеза геномов откроется лишь при полном понимании работы генетического аппарата как комплексной системы. Как уже упоминалось ранее, за последние четыре десятилетия научное сообщество выяснило лишь

то, что 1% генома отвечает за синтез белков клетки, ещё около 30% обладают, как считается, регуляторными функциями. Оставшиеся 70% остаются «темной материей», последовательностями с неизвестными функциями и не до конца изученной структурой.



Интересное неконформное направление синтетической биологии, которое лишь намечается в череде фундаментальных исследований – заимствование находок из исследований других царств. Например, более широкое понимание системы сигналинга в ответ на повреждение ДНК могут дать исследования на растениях. Растительные клетки обладают гораздо более широким спектром защитных механизмов, к тому же, растения могут быть более предпочтительной моделью для исследования выживаемости больших объемов ткани. Механизмы ответа на повреждения ДНК высоко консервативны между царствами, в связи с чем подобные междисциплинарные исследования могут быть применены для новых синтетических разработок в сфере онкологии (например, для оценки хемо- или радиочувствительности) или экологии.

7. Проблемы на пути к публикациям в высокорейтинговых журналах

Несмотря на растущий уровень критики существующей системы метрической оценки работы учёных и политики издательств, публикация в журнале сегодня – всё ещё

неотъемлемый элемент построения карьеры в научном сообществе. К сожалению, в России таким показателям как импакт-фактор журнала и индекс Хирша ученого уделяется гораздо больше внимания, чем это необходимо для органического развития отрасли.

В первую очередь хотелось бы отметить, что оказываемое на научных сотрудников давление приводит к смещению фокуса внимания с действительно значимых показателей на формальные характеристики. Не секрет, что в некоторых учреждениях налажена схема цитирования сотрудниками друг друга, причем им удается избегать самоцитирования и цитирования соавторами. Это способствует приросту среднего индекса Хирша, а несовершенство системы РИНЦ не позволяет отследить такие откровенно мошеннические действия. Однако работа по такой схеме требует вложения значительного ресурса как от руководства, так и от сотрудников. В результате качество самих публикаций существенно снижается – и тем не менее, уровень цитируемости таких работ будет высоким.

Чтобы избежать описанного «побочного эффекта», оценку публикации следует проводить не по формальным признакам, но оценивая её потенциал. Например, узкоспециальные журналы редко обладают импакт-фактором больше 5. Однако такая публикация имеет больше шансов привлечь внимание специалистов в соответствующей области и создать благоприятный имидж научной группы в профильном сообществе. В долгосрочной перспективе это более выгодно для исследователя, поскольку открывает больше возможностей для международных контактов, коллабораций и грантов.

Говоря о грантовом финансировании, серьезную проблему для качества публикаций представляют и требования российских фондов к грантополучателям. Условием РФФ, к примеру, является публикация двух статей в год, причем, начиная с первого года работы. В реальности едва ли существует научная группа, которая подает заявку на грант РФФ, не имея серьезного экспериментального задела, иногда даже – готовые к публикации статьи. Такую ситуацию невозможно признать естественной и стимулирующей проведение качественных научных исследований. Серьезная, вдумчивая подготовка одной статьи может занимать несколько месяцев, а процесс рецензирования и публикации – в среднем, полгода. В результате, усилия направляются на соблюдение формальных требований фонда к числу публикаций, а не на экспериментальную деятельность. Это, конечно же, не способствует качеству выпускаемых статей и снижает общий темп исследования.

Время, которое отводится научной группе на получение значимого результата – ещё один вопрос, требующий пересмотра. Выделение двух- и трехлетнего финансирования, тем более, с требованием публикабельных результатов уже в первый год работы, никак не может стимулировать научный процесс. От начала работы в принципиально новом направлении до получения первых осмысленных результатов, как правило, проходит 5-7 лет (эту динамику легко отследить по числу статей). Для достижения же порога прорывного знания может потребоваться гораздо больше времени. Следствием такой политики финансирования фундаментальных исследований является «безопасная игра» - работа в исторически сложившемся в учреждении/подразделении направлении, избегание высокорисковых исследований. Неприятие отрицательных результатов, между тем, также

вносит свой отрицательный вклад в сложившуюся ситуацию. Несмотря на то, что при ретроспективном анализе развития любой научной отрасли экспериментальное опровержение теорий обладает столь же высокой ценностью, как их выдвижение и подтверждение, наукометрическая гонка практически подавила этот тип исследований.

Интересен и тот факт, что финансирование по федеральным целевым программам, направленное не на фундаментальные исследования, а на разработку прикладных технологий и готовых продуктов, длится 10 лет. Если следовать существующим принципам финансирования, фундаментальное открытие должно быть совершено за 2-3 года, в то время как на внедрение его в практическое использование необходимо в три раза больше времени. С такой логикой сложно согласиться.

Следует обратить внимание и на то обстоятельство, что чем больше размер финансирования, тем строже требуются именно практически значимые результаты. Необходимость имитации практического выхода увеличивает патентную нагрузку на научные учреждения, и безусловно, ограничивает поле деятельности ученых. Если проанализировать спектр публикаций в журналах с действительно высоким импакт-фактором, можно увидеть, что на они посвящены сугубо фундаментальной проблеме. Практическая значимость таких результатов не может быть оценена в перспективе ближайшей пары лет, а только в масштабах нескольких десятилетий, когда станет очевидным их вклад в развитие области в целом. Судьба научного проекта не должна зависеть от возможностей его коммерциализации, а оценка должна проводиться на основе новизны и оригинальности идеи.

Еще одной проблемой финансирования исследований является планирование исходя из оптимистичного прогноза. Реальность же экспериментальной науки такова, что методические неудачи сопровождают даже прекрасно отлаженную технологию. Ни одна известная автору смета, тем временем, не предполагает несколько сценариев развития работы, а отклонение от сметы обычно имеет резко негативные последствия. Жесткость календарных и финансовых планов научных проектов видится рудиментом предыдущего поколения исследований, которые существенно отличались от современных: и принципом целеполагания, и возможностью получения ожидаемых результатов. Исследования с использованием омиксных технологий сложно прогнозируемы, а фактологическая недостаточность (в силу ранней стадии развития этой области) препятствует объективной оценке получаемых данных.

Технологический уклон мышления нового поколения исследователей является следствием необходимости соблюдения жесткого временного графика научного проекта. В связи с чисто формальной оценкой полученных результатов финансирующими организациями часто коллективу бывает достаточно выполнить поставленные количественные цели: собрать биоматериал определенного количества испытуемых, секвенировать заявленное число образцов. На первый план выходит стремление поддерживать используемый прибор в работоспособном состоянии. Вопросы о дорогостоящем ремонте и, тем более, регулярном техническом обслуживании инженером

компания-производителя обычно не находят понимания на уровне распределения средств. Результатом становится приобретение скорее инженерной квалификации учеными-экспериментаторами: часто сотрудник до мельчайших подробностей знает устройство прибора, однако совершенно не способен осмыслить получаемые на нем данные. То же верно и для исследователей, работающих с клеточными культурами и животными моделями. Выделение отдельного бюджета на пул техников-лаборантов, которые бы взяли на себя рутинные лабораторные процедуры, могло бы стать решением этой проблемы. К сожалению, размер научного гранта не позволяет рассчитывать даже на проектную занятость лаборанта.

Выделяемых средств редко хватает на полноценную работу одной группы, в то время как в мировой практике коллаборации – естественный механизм проведения масштабных исследований, и как следствие, высокорейтинговых публикаций. Если обратить внимание на финальные слайды впечатляющих докладов на конференциях, в практически любом исследовании принимает участие 2-5 лабораторий из разных городов или даже стран. В результате геополитической ситуации российские ученые сильно депривированы международными коллаборациями. Таможенные ограничения делают практически невозможным обмен биообразцами и реактивами, стимулируя их незаконную перевозку. Известны инциденты с задержанием и угрозой уголовной ответственности за подобную деятельность (например, громкое дело Д. Лопатина, в итоге вынужденного покинуть Россию).

Физические поездки за рубеж необходимы для обмена опытом, освоения новейших технологий и методик, приобретения полезных связей. Особенно важны в этом плане поездки на международные конференции. Неформальное общение и кулуарные дискуссии – источник ценнейшей информации, которую невозможно получить, читая научные статьи или даже профильные интернет-форумы. Хорошо известно и то, что публикации в зарубежных журналах часто имеют в своей основе личные договоренности с членами соответствующих редколлегий. Для достижения этой цели полезно налаживание долгосрочных связей между молодыми учеными, поскольку в конечном итоге именно сегодняшние аспиранты в будущем придут на смену редакторам и рецензентам научных изданий. Важность поездок на международные конференции крайне недооценена. Здесь можно привести пример из личного опыта автора: размера гранта при продлении его на следующий год был сокращен на сумму, заявленную группой для поездки на профильную конференцию. Подобная политика – это искусственно создаваемая дополнительная изоляция российских научных сотрудников.

Нельзя обойти вниманием и ситуацию с внутривосскими коллаборациями. Недостаточность финансирования провоцирует нездоровую конкурентную среду среди российских научных учреждений. Цитируемость научных групп одного профиля, работающих в разных организациях, стремится к нулю. При этом, каждое учреждение стремится создать инфраструктуру из полного спектра доступных технологий. Это приводит к тому, что созданные в течение последних лет биобанки, например, способные

вместить сотни тысяч образцов, содержат на хранении, в среднем, от 1 до 5 тысяч. Некоторые учреждения обладают целым парком высокопроизводительных секвенаторов, однако запуск производится не чаще нескольких раз в год. Закупка оборудования исходя из оптимистичного прогноза развития организации приводит к нехватке средств на поддержание необходимого штата сотрудников или закупку реагентов в количестве, соответствующему мощностям приборов. В этой ситуации наиболее естественным решением видится перенаправление расходов по закупке нового оборудования на коллаборации с учреждениями, уже имеющими его. Объединение биокolleкций и методической базы также, вопреки распространенному среди отечественных ученых мнению, способствует развитию исследовательских проектов и позволяет претендовать на более высокий уровень научных публикаций.

Резюмируя вышеизложенной, основными препятствиями на пути к публикациям в высокорейтинговых журналах на взгляд автора являются: необходимость выполнять многочисленные формальные требования к публикационной активности, практическая нацеленность исследований, большой объем рутинной нагрузки, жесткие временные и финансовые рамки, изолированность научных групп (как международная, так и внутри страны).

Литературные источники

1. Nakka K., Ghigna C., Gabellini D., et al. Diversification of the muscle proteome through alternative splicing- 2018. - P. 1–18.
2. Younis I., Dittmar K., Wang W., et al. Minor introns are embedded molecular switches regulated by highly unstable U6atac snRNA // eLife. - 2013. - V. 2(e00780). - P. 1–14.
3. Snyder S.H., Kim P.M. D-amino acids as putative neurotransmitters: focus on D-serine. // Neurochemical research. - 2000. - V. 25(5). - P. 553–60.
4. Parchaňský V., Kapitán J., Bouř P. Inspecting chiral molecules by Raman optical activity spectroscopy // RSC Adv. - 2014. - V. 4(100). - P. 57125–57136.
5. van der Meer L., Kagohara D., Roche L., et al. Teaching multi-step requesting and social communication to two children with autism spectrum disorders with three AAC options. // Augmentative and alternative communication (Baltimore, Md. : 1985). - 2013. - V. 29(3). - P. 222–34.
6. Han H.-R., Kim K., Murphy J., et al. Community health worker interventions to promote psychosocial outcomes among people living with HIV—A systematic review // PLOS ONE. - 2018. - V. 13(4). - P. e0194928.
7. Umemori J., Karpova N.N. A Protocol for the Simultaneous Analysis of Gene DNA Methylation and mRNA Expression Levels in the Rodent Brain // Epigenetic Methods in Neuroscience Research- 2016. C. 65–85.
8. Puray-Chavez M., Tedbury P.R., Huber A.D., et al. Multiplex single-cell visualization of nucleic acids and protein during HIV infection. // Nature communications. - 2017. - V. 8(1). - P. 1882.
9. Nath R.D., Bedbrook C.N., Abrams M.J., et al. The Jellyfish *Cassiopea* Exhibits a Sleep-

- like State // *Current Biology*. - 2017. - V. 27(19). - P. 2984-2990.e3.
10. Watters K.E., Fellmann C., Bai H.B., et al. Systematic discovery of natural CRISPR-Cas12a inhibitors. // *Science (New York, N.Y.)*. - 2018. - V. 362(6411). - P. 236–239.
 11. Schindler S.E., Gray J.D., Gordon B.A., et al. Cerebrospinal fluid biomarkers measured by Elecsys assays compared to amyloid imaging. // *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. - 2018. - V. 14(11). - P. 1460–1469.