

Моделирование редких генетических патологий

Использование биоинформатических инструментов и модельных организмов для изучения патогенеза редких заболеваний. Особое внимание уделено технологии CRISPR/Cas9 в создании моделей и анализе мутаций.



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Цели:

- Понять значимость редких генетических патологий
- Рассмотреть методы моделирования: клеточные культуры, дрозофилы, мыши
- Оценить роль CRISPR/Cas9
- Проанализировать примеры моделей заболеваний

Что такое редкие заболевания?

- Редкие (орфанные) заболевания — патологии, встречающиеся реже 10 случаев на 100 000 населения. Они затрагивают небольшие группы пациентов, но в совокупности составляют серьёзную медицинскую и социальную проблему.

Классификация

Список орфанных заболеваний, встречающихся на территории России, включает следующие категории:

- **Микозы:** зигомикоз, мукормикоз и т.д.
- **Новообразования:** тимома, злокачественная саркома мягких тканей и т.д.
- **Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм:** талассемии, атипичный гемолитико-уремический синдром и т.д.
- **Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ:** гиперпролактинемия, кистозный фиброз и т.д.
- **Психические расстройства и расстройства поведения:** синдром Ретта и т.д.
- **Болезни нервной системы:** первичная гиперсомния, гипертрофическая невропатия у детей и т.д.
- **Болезни глаза и его придаточного аппарата:** наследственные ретинальные дистрофии, атрофия зрительного нерва и т.д.
- **Болезни системы кровообращения:** первичная легочная гипертензия, желудочковая тахикардия и т.д.
- **Болезни кожи и подкожной клетчатки:** саркома мягких тканей, болезнь Дюринга и т.д.
- **Болезни органов дыхания:** гранулематоз Вегенера и т.д.
- **Болезни органов пищеварения:** язвенный колит желудка и т.д.
- **Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани:** синдром Маджид, синдром дуги аорты и т.д.
- **Болезни мышц:** фибродисплазия оссифицирующая прогрессирующая и т.д.
- **Болезни мочеполовой системы:** наследственные формы азооспермии, нефротический синдром и т.д.
- **Врожденные аномалии переднего сегмента глаза:** аниридия и т.д.
- **Врожденные аномалии, деформации и хромосомные нарушения:** болезнь Гиршпрунга, поликистоз почек прогрессирующий и т.д.

Распространённость редких заболеваний

- В России зарегистрировано 284 орфанных заболевания. Из них 17 включены в перечень жизнеугрожающих, хронически прогрессирующих состояний, сопровождающихся инвалидизацией и сокращением продолжительности жизни. Около 40 тысяч пациентов имеют подтверждённые диагнозы.

Генетическая природа редких заболеваний

- До 80% редких болезней имеют генетическую природу. Часто они обусловлены мутациями в единственном гене. Многие из них проявляются в детстве и требуют ранней диагностики для своевременного вмешательства.

Почему нужны модели заболеваний?

- Модели позволяют:
 - - Понять патогенез заболевания
 - - Выявить мишени для терапии
 - - Оценить эффективность лекарств
 - - Разработать персонализированные подходы к лечению

Мутация

Модель

Патогенез

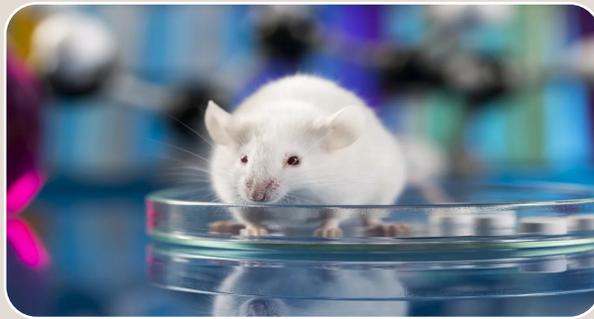
Терапия

Модельные организмы: обзор

Наиболее популярные системы моделирования:



Дрозофила (*Drosophila melanogaster*).
Преимущества данной модели – быстрая смена поколений.



Мыши (*Mus musculus*). Наиболее оптимальная модель для исследования генов млекопитающих.

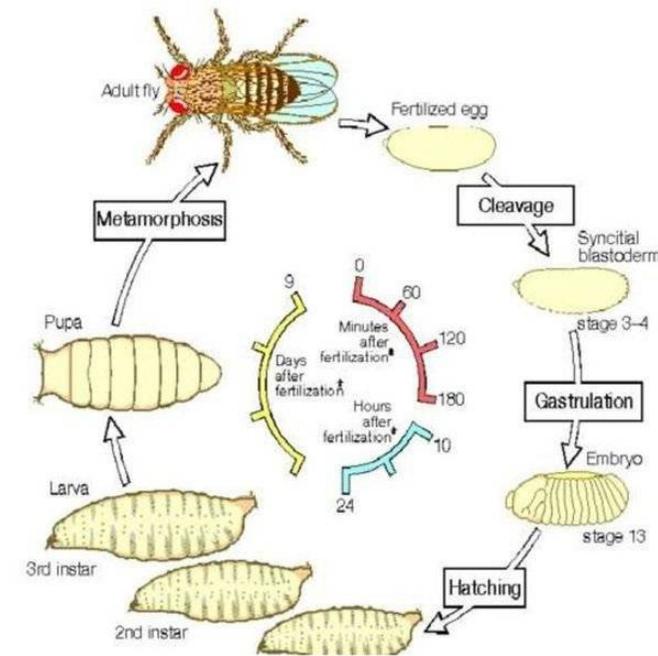


Клеточные культуры (включая iPSC). С помощью данной модели возможно использование точечного моделирования.

Моделирование на дрозофиле

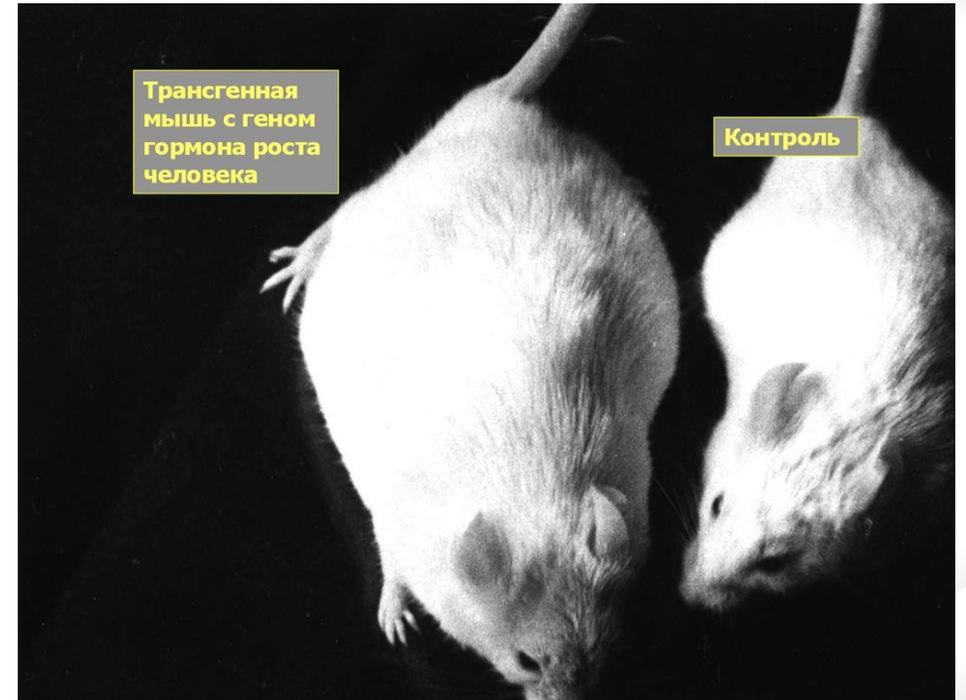
- Преимущества:
- - Быстрый цикл развития
- - Генетическая простота
- - Возможность визуализации процессов *in vivo*
- Применение: нейродегенеративные заболевания, метаболические нарушения, скрининг генов и соединений.

Жизненный цикл дрозофилы



Моделирование на мышах

- Преимущества:
 - - Сходство с человеком на уровне органов и физиологии
 - - Наличие множества мутантных линий
- Недостатки:
 - - Высокая стоимость содержания
 - - Этические ограничения
- Применение: моногенные заболевания, раковые и иммунные патологии.



Клеточные модели

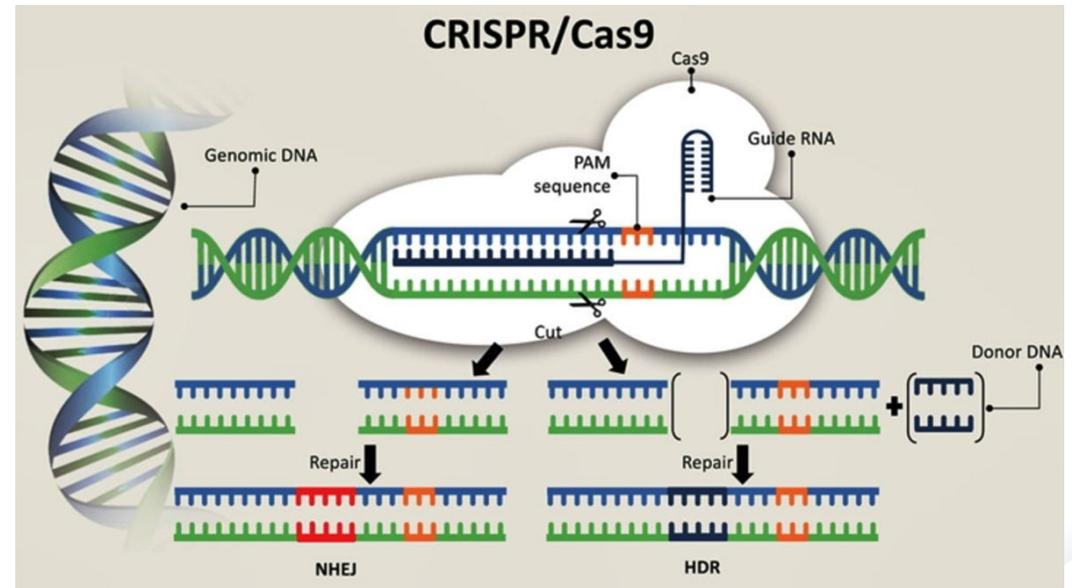
- Клеточные модели — один из самых гибких инструментов для изучения молекулярных механизмов заболеваний. Это могут быть: первичные культуры клеток, взятых у пациента; линии трансформированных клеток; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), полученные из зрелых клеток пациента и дифференцируемые в специфические типы клеток. Также активно развиваются 3D-культуры — органоиды, имитирующие структуру настоящих тканей.

Инструменты биоинформатики

- Используются для:
- Поиска мутаций (WES/WGS);
- Прогнозирования патогенности (PolyPhen, SIFT);
- Проектирования sgRNA для CRISPR;
- Анализа экспрессии генов (RNA-seq);
- Интеграции данных о взаимодействии белков и путей.

CRISPR/Cas9: базовые принципы

- Система CRISPR/Cas9 используется как «генетические ножницы». Cas9 — фермент, разрезающий ДНК, а направляющая РНК (sgRNA) определяет точное место разреза. После разреза ДНК может быть либо восстановлена с ошибками, либо модифицирована по заданному шаблону, что позволяет воспроизводить или исправлять конкретные мутации.



CRISPR в моделировании заболеваний

- CRISPR/Cas9 позволяет вносить точные мутации для имитации редких заболеваний. С его помощью можно создавать *in vitro* и *in vivo* модели, проводить скрининг мутаций и даже корректировать дефектные гены. Это даёт возможность изучать последствия мутаций и разрабатывать терапию.

Пример: болезнь Хантингтона

- Болезнь Хантингтона вызвана увеличением числа повторов CAG в гене HTT. Модели на мышах и дрозофилах позволяют изучать нарушения моторики, когнитивной функции и нейродегенерацию. Они также используются для тестирования потенциальных методов лечения, включая антисмысловые олигонуклеотиды.

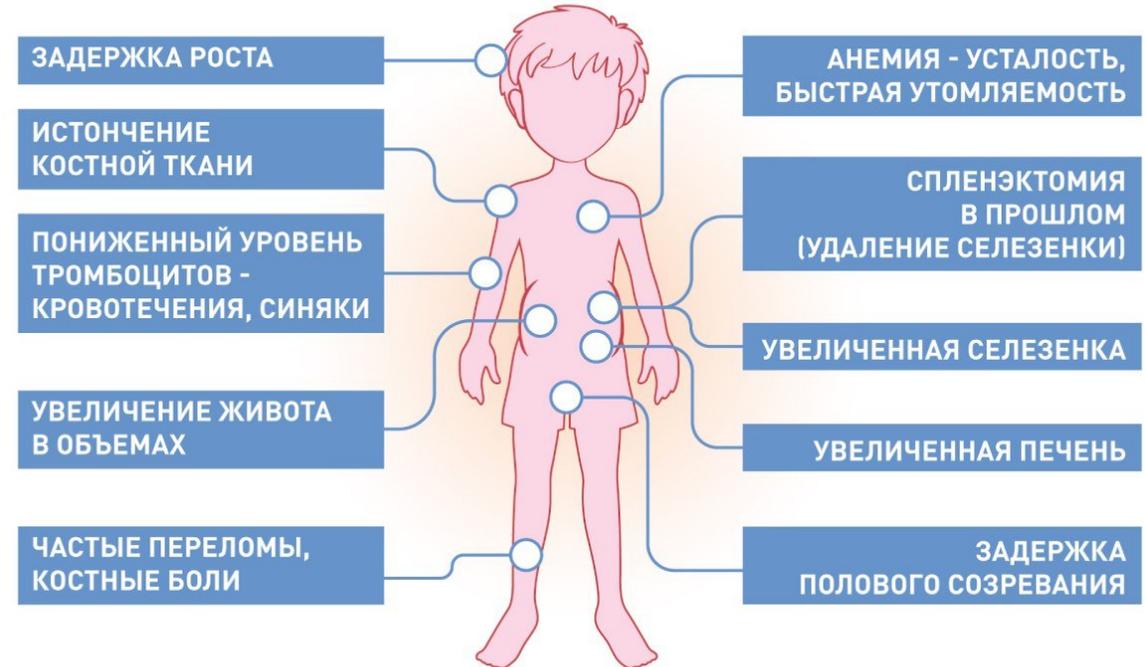
БОЛЕЗНЬ ГЕНТИНГТОНА

- Аутосомно-доминантный тип наследования с 100% пенетрантностью патологического гена
- Начало заболевания в 40-60 лет
- Генерализованный хореический гиперкинез (непроизвольные быстрые, хаотичные, нерегулярные по времени и амплитуде движения с вовлечением мышц лица, глотки, туловища, конечностей)
- Прогрессирующая деменция подкоркового характера (нарушения управляющих функций, снижение концентрации внимания, зрительно-пространственные расстройства, нарушения памяти в виде недостаточности воспроизведения)
- Поведенческие нарушения: раздражительность, агрессивность, позже – апатия.

Пример: болезнь Гоше

- Болезнь Гоше связана с дефицитом фермента β -глюкоцереброзидазы (GBA1), что вызывает накопление липидов в клетках. Используются мышинные модели с мутацией GBA1 и iPSC-модели, позволяющие исследовать заболевание на уровне нейронов и лизосомной дисфункции.

СИМПТОМЫ БОЛЕЗНИ ГОШЕ



Пример: синдром Ретта

- Синдром Ретта — X-сцепленное заболевание, вызванное мутациями в гене MECP2. Мышиные и клеточные модели демонстрируют двигательные и когнитивные нарушения, что позволяет изучать эпигенетические механизмы и разрабатывать возможные терапии.

Синдром РЕТТА

- Расстройство к настоящему времени описано только у девочек.
- Раннее развитие нормально или внешне нормально.
- Начало расстройства между 7 и 24 месяцами.
- Парциальная или полная потеря мануальных навыков и речи.
- Замедление роста головы.

Наиболее характерно:

- потеря спонтанных движений рук.
- стереотипное "заламывание", "мытье" рук, смачивание слюной;
- неполное пережёвывание пищи;
- одышка.
- В среднем возрасте развитие атаксии, апраксии, сколиоза и кифосколиоза, хореоатетозных расстройств, нередко - эпилептических припадков.
- Исход заболевания - тяжёлая психическая инвалидность.



Преимущества моделирования

- Модели позволяют понять механизмы заболевания, протестировать потенциальные лекарства и разработать персонализированную медицину. Также они являются основой для исследований генотерапии и новых подходов к лечению.

Ограничения моделей

- Не все модели полностью воспроизводят клиническую картину. Существуют различия между организмами, этические проблемы и трудности переноса результатов на человека. Поэтому важна комплексная интерпретация данных и использование нескольких подходов одновременно.

Ограничения моделей: человек vs МЫШЬ

Параметр	Мышиная модель	Человеческий организм	Последствия для исследований
Метаболизм лекарств	Быстрый (цитохром P450 отличается)	Медленный (другие изоформы P450)	Ложноположительные результаты токсичности
Иммунный ответ	Преобладает Th1-ответ	Сбалансированный Th1/Th2	Непредсказуемость иммунотерапии
Геномные различия	85% совпадения генов	Уникальные регуляторные элементы	Off-target эффекты CRISPR не совпадают
Продолжительность жизни	2-3 года	70+ лет	Невозможность изучения поздних стадий
Физиология органов	Миниатюрные почки (1.5% от массы тела)	Крупные почки (0.5% от массы)	Ошибки в дозировках препаратов

Будущее: органоиды и генотерапия

- Органоиды, особенно из iPSC, всё больше используются для изучения заболеваний. Редактирование генома *in vivo* с помощью векторов и скрининг лекарств в 3D-культурах приближают лабораторные исследования к клинической практике.

Клиническая трансляция

- Моделирование способствует переходу от лаборатории к клинике: тестируются лекарства, подбираются биомаркеры, оценивается эффективность генотерапии. Некоторые препараты уже применяются на практике, как в случае спинальной мышечной атрофии.

Этические аспекты

- При работе с моделями важна этика: соблюдение норм при экспериментах на животных, защита персональных данных пациентов, ограничение редактирования генома в герминативных линиях. Необходим баланс между наукой и ответственностью.

Выводы

- Моделирование редких генетических заболеваний — ключ к пониманию патогенеза и разработке новых подходов к лечению. Биоинформатика, клеточные и животные модели, технологии редактирования генома делают возможным переход к персонализированной медицине.