



Успешные практики УрФУ

**Новая тест-система
метаболома микробиоты
на основе ВЭЖХ-МС
для диагностики
и персонифицированного
лечения заболеваний
различного генеза**

Уральский
федеральный
университет

приоритет2030[^]
лидерами становятся

Новая тест-система метаболома микробиоты на основе ВЭЖХ-МС для диагностики и персонализированного лечения заболеваний различного генеза

Сегодня перспективным направлением для постановки диагноза заболеваний различного генеза является определение специфических микробных маркеров в крови, количество которых зависит как от вида заболевания, так и от тяжести его протекания. Характерной особенностью такого подхода является возможность определения основного массива анаэробной и аэробной микрофлоры, микроскопических грибов и вирусов. Этиологическая диагностика микробиоты кишечника играет важную роль для изучения эпидемиологии заболевания, определения дальнейшей тактики персонализированного ведения пациентов, подбора оптимальной таргетной этиотропной терапии и определяет благоприятный исход лечения.

Практика посвящена разработке методики и технологии метаболического профилирования кишечной микробиоты по биомаркерам крови на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) для ранней диагностики и персонализированного лечения заболеваний различного генеза, в частности иммунодефицитных состояний на моделях лабораторных животных (мышей) с использованием библиотек микробных маркеров крови для выявления взаимосвязи состава микробиоты с нозологическими состояниями. Метод ВЭЖХ-МС позволяет при минимуме затрат на пробоподготовку и отсутствии необходимости дериватизации веществ проводить достоверный анализ содержания индивидуальных липидов, аминокислот и витаминов в качестве микробных маркеров крови. При этом сводятся к минимуму потери определяемых компонентов смесей, а также существенно расширяется спектр определяемых компонентов.

Результатом работы являются методики и программно-аппаратные решения для реализации тест-системы метаболома микробиоты. Методика обработки результатов измерений, построенная на базе искусственной нейронной сети (ИНС), позволит устанавливать изменения состава крови по более чем 10 000 молекулярным маркерам.

Практика предполагает адаптацию полученных результатов под физиологию человека и применение результатов в клинической практике, поставки тест-системы в многопрофильные больницы, диагностические центры, НИИ генетики и R&D фармкорпораций.

Какую задачу решаем

Разработать тест-систему нового типа для определения метаболома кишечной микробиоты по биомаркерам крови на основе ВЭЖХ-МС для ранней диагностики и персонализированного лечения заболеваний различного генеза, в частности иммунодефицитных состояний на моделях лабораторных животных (мышей) с использованием международных библиотек для выявления взаимосвязи состава микробиоты и микробных маркеров крови для внедрения разработанных принципов и технологий в медицинскую лабораторную практику.

Описание

Первым этапом практики является создание тестовой биологической модели экспериментального иммунодефицитного состояния у мышей и определение характеристик такого состояния по анализам крови, миелограмме костного мозга.

Экспериментальный иммунодефицит моделируется путем внутрибрюшинного введения циклофосамида (Эндоксан®, Бакстер Онкология ГмБХ, Германия), алкилирующего агента, угнетающего гуморальный и клеточный ответ. Исследуются гематологические показатели и определяется общая клеточность костного мозга и подсчет миелограммы. Выраженное угнетение эритроидного ростка (снижение количества миелокариоцитов костного мозга, зрелых эритроцитов, гемоглобина в них) вызывает компенсаторный ответ гранулоцитарного и лимфоцитарного рядов. Изучаются образцы плазмы интактных животных и животных с инъектированным циклофосамидом (для создания иммунодефицитного состояния) для ВЭЖХ-исследования.

Вторым этапом практики является разработка методик пробоотбора и пробоподготовки плазмы крови лабораторных животных (мышей) для проведения экстракции предполагаемых биомаркеров, таких как липиды, включая жирные кислоты, аминокислоты и витамины. Масс-спектрометрия (МС), обладающая способностью предоставлять структурную информацию о химических соединениях, является основным методом анализа в липидомических исследованиях и исследованиях аминокислот и витаминов. После отбора проб они должны быть немедленно проанализированы или заморожены до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, иначе будут продолжаться многие ферментативные и химические процессы, способствующие в конечном счете метаболизму липидов. Пробоподготовка должна обеспечивать снижение сложности состава образца за счет удаления любых нежелательных соединений, в том числе приводящих к дополнительному загрязнению масс-спектрометра, а также увеличивать содержание в пробе интересующих аналитов (липидов), что должно способствовать улучшению соотношения сигнал/шум в результатах измерений ВХЖЭХ-МС. В липидомике наиболее широко используется такой метод пробоподготовки, как жидко-жидкостная экстракция.

Результаты измерений проб должны проходить идентификацию веществ с применением соответствующих баз данных, а далее подвергаться анализу средствами ИНС на предмет соответствия обнаруженной картины метаболома микробиоты кишечника организма в его крови тем или иным патологическим состояниям организма и степени развития этих состояний. Для правильной работы ИНС она требует предварительного обучения на примерах с априори заданными нарушениями здоровья.

Адаптация полученных результатов под физиологию человека обеспечит получение тест-системы, пригодной для применения в клинической практике. Такая тест-система интегрирует несколько методик, при качественном выполнении которых будет выдавать достоверный диагностический результат о наличии/отсутствии патологии, а в случае обнаружения патологии, если уместно, то будет определяться и степень ее развития.



Группа методик тест-системы:

1. Методика пробоотбор: подготовка пациентов к исследованиям, процедура забора крови, отделение плазмы, маркировка, хранение, перевозка, контроль состояния образцов биоматериалов.
2. Методика пробоподготовки для 3-мерной диагностики ВЭЖХ и ВЭЖХ/МС анализа: жирные кислоты, аминокислоты, органические кислоты и витамины.
3. Методика 3-мерной диагностики ВЭЖХ и ВЭЖХ/МС анализа (жирные кислоты, аминокислоты, органические кислоты и витамины).
4. Методика машинной обработки полученных хроматограмм и сходимости результатов с применением баз данных веществ.
5. Методика обучения ИНС определению трансформаций метаболических путей и сочетанных с ними нозологических состояний по изменениям концентрации сигнальных веществ и метаболитов.

Поставки тест-системы в многопрофильные больницы, диагностические центры, НИИ генетики и R&D фармкорпораций.

Необходимые ресурсы

Для применения разработки в клинической практике потребуются:

1. Медицинская лаборатория (МЛ) – осуществляет забор проб крови человека, в том числе выполняет подготовку пациентов к исследованиям, процедуру забора крови, отделение плазмы, маркировку, хранение, а также перевозку образцов в измерительные лаборатории. Специальное оснащение МЛ для реализации практики не требуется, достаточно стандартного набора оборудования для забора крови. В качестве МЛ могут выступать лаборатории медицинских учреждений (больниц, госпиталей), а также частные лаборатории. Ключевая задача МЛ – получение первичного биоматериала. География МЛ не имеет ограничений, биоматериал может собираться в любой точке мира.
2. Измерительная лаборатория (ИЛ) – получает биоматериал от МЛ, выполняет пробоподготовку и измерения на ВЖЭХ-МС в соответствии с разработанными нами методиками. ИЛ требует в перечне своего оборудования наличие дорогостоящего аппарата для измерения ВЖЭХ-МС (типичная стоимость прибора – от 30 до 50 млн рублей), а также наличие соответствующих квалифицированных специалистов для его эксплуатации. Одна ИЛ способна обслуживать запросы от многих МЛ, в связи с чем количество ИЛ может быть существенно меньше количества МЛ. Возможно совмещение ИЛ и МЛ в единые лаборатории. Ключевая задача ИЛ – получение аппаратных спектров ВЖЭХ-МС анализируемого биоматериала.
3. Цифровая лаборатория (ЦЛ) – получает результаты аппаратных измерений ВЖЭХ-МС, осуществляет их расшифровку с применением баз данных веществ и анализ с помощью ИНС на предмет выявления патологий. Результаты работы ЦЛ, собственно, являются результатами диагностики. Работа ЦЛ требует использования компьютерных вычислительных систем, а также надежного канала связи с ИЛ и используемыми базами данных. Для реализации практики, закрывающей потребности всего мира, достаточно одной ЦЛ. Более того реализация тест-системы на одной ЦЛ обеспечивает надежный учет количества выполненных измерений, а также при вовлечении разработчиков позволяет вести постоянное совершенствование методики работы ИНС, повышать точность диагностики, расширять перечень диагностируемых патологий.

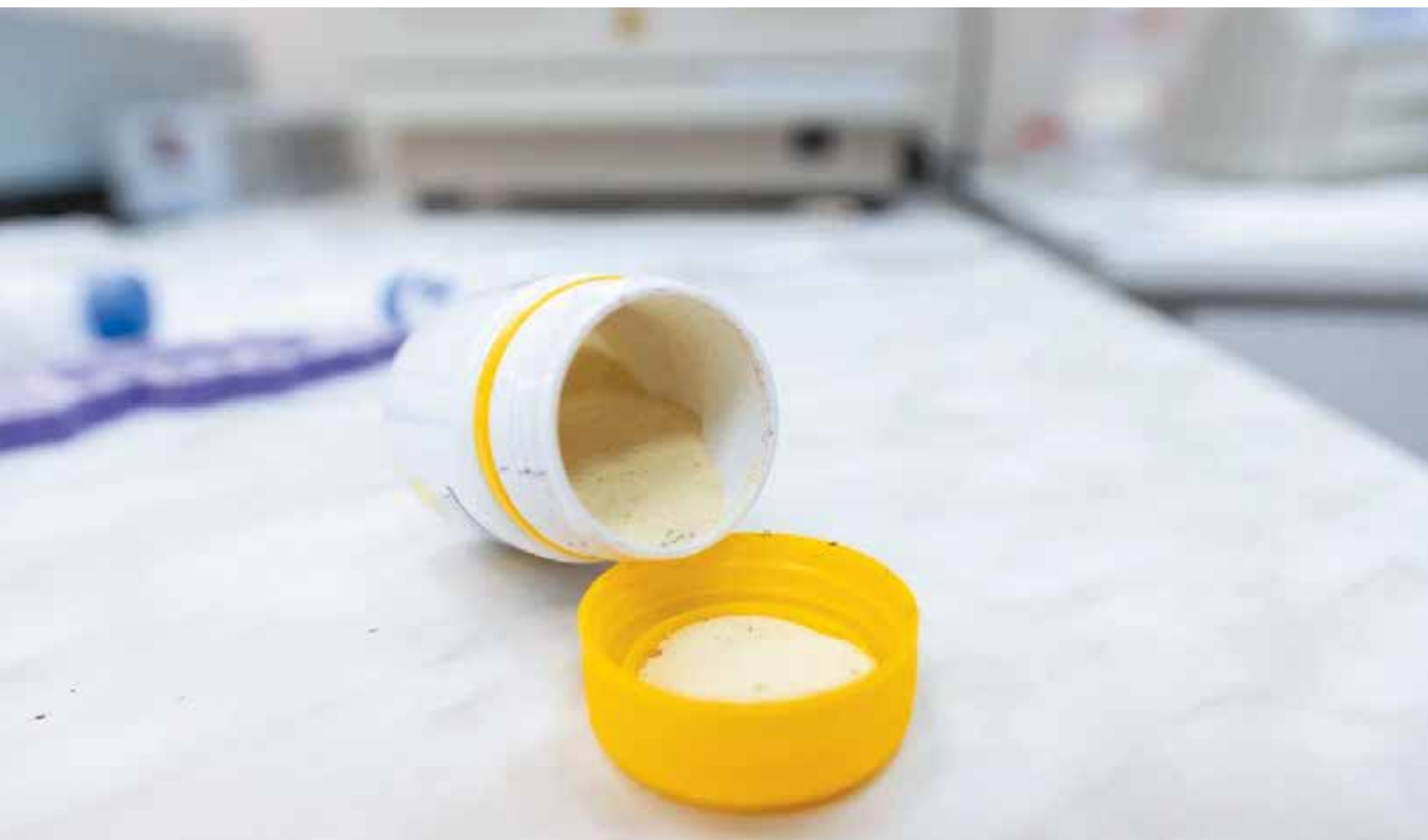
Ограничения и риски

Применение разработки в клинической практике требует получения соответствующих разрешительных документов, состав которых и порядок получения зависит от местного законодательства. В России необходимые разрешительные документы и порядок их получения регулируются Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан» и Приказом Минздрава РФ от 30.11.2017 № 965.

Научно-технический риск невозможности завершения разработки тест-системы (вероятность наступления – очень низкая, тяжесть последствий – высокая). Накопленные первичные данные позволяют уже говорить о надежной возможности выполнения диагностики патологических состояний организмов млекопитающих по состоянию микробиоты их кишечника. Для купирования риска ведется работа с исходными данными, содержащими необходимые подборки образцов организмов с типичными патологиями.

Организационный риск невозможности создания цепочки лабораторий для реализации тест-системы (вероятность наступления – очень низкая, тяжесть последствий – высокая). Уже сегодня существует весь перечень лабораторий с соответствующим оснащением, необходимый для создания цепочки. Для купирования риска ведется работа с заинтересованным в реализации тест-системы индустриальным партнером.

Организационный риск невозможности регистрации тест-системы (вероятность наступления – низкая, тяжесть последствий – высокая). Часть необходимых методик, в том числе касающиеся забора крови, сегодня уже успешно реализуются многими медицинскими лабораториями, чего в значительной степени достаточно для получения необходимых биоматериалов. Остальные методики тест-системы не касаются медицинского вмешательства, хотя в целом результат диагностики требует верификации. Для купирования риска ведется работа с заинтересованным в реализации тест-системы индустриальным партнером.



Эффекты



Внедрение практики существенно упрощает диагностику широкого круга нарушений здоровья человека, позволяет своевременно обнаруживать опасные патологии и предпринимать меры для их исправления. Все это повышает общие показатели здоровья общества, улучшает качество и продолжительность жизни людей.

Для пациентов использование тест-системы не отличается от обычной сдачи крови на развернутый анализ, но открывает им возможности ранней и точной диагностики сложно диагностируемых заболеваний.

Для медицинских лабораторий предлагаемая практика существенно расширяет ассортимент предлагаемых услуг и позволяет с применением относительно простых средств забора крови получать дополнительные заказы, увеличивать объемы своего бизнеса.

Для цифровой лаборатории и разработчика тест-системы внедрение практики обеспечивает регулярный доход, что отрывает возможность для дальнейшего совершенствования и расширения возможностей разработки.

Основные этапы внедрения

1. Отработка методик тест-системы на лабораторных животных (исследования и разработки), срок исполнения – конец 2025 г.
2. Перенос возможностей тест-системы на диагностику патологических состояний человека (исследования и разработки), срок исполнения – конец 2026 г.
3. Получение разрешительных документов (совместно с индустриальным партнером АО «НИИТФА»), срок исполнения – конец 2027 г.
4. Внедрение тест-системы в практику работы медицинских лабораторий (совместно с индустриальным партнером АО «НИИТФА»), срок исполнения – конец 2027 г.
5. Дальнейшее расширение и совершенствование тест-системы, с 2027 года.

На ранних этапах развития практики после завершения цикла исследований и разработок потребуется формирование соответствующей бизнес-активности для получения необходимых разрешительных документов и организации цепочки лабораторий. В частности, для внедрения практики и реализации тест-системы потребуется определение точек выполнения

аппаратных измерений биоматериала и организация измерительных лабораторий, а также организация цифровой лаборатории для обработки аппаратных измерений и формирования диагностического заключения. Становление практики потребует подготовки соответствующих специалистов.

Рекомендации

1. Ввести внедрение тест-системы и обучение ИНС совместно с УрФУ поэтапно с учетом специфики спектра услуг и диагностики заболеваний каждой лаборатории.
2. Пройти обучение для специалистов по программе дополнительного профессионального образования в УрФУ

Контакт автора



Ковалева Елена Германовна

доцент кафедры технологии органического синтеза
Химико-технологического института

+7 912 26 42 251

e.g.kovaleva@urfu.ru