

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДИАГНОСТИКИ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЙ РАЗНЫХ ТИПОВ МИКРОРНК

Руководитель темы Костарева А.А.

Ответственный исполнитель Федоров А.В.

Обоснование принятого направления исследований, метода определения абсолютных уровней циркулирующих микроРНК и выбор конкретных молекулярных мишеней

По результатам изучения научно-технической литературы по теме проекта было определено оптимальное направление исследований и сформулированы основные подходы по решению задач проекта направленные на разработку инновационного метода оценки ишемического/реперфузионного повреждения миокарда с помощью анализа микроРНК. Для решения задач настоящего проекта в качестве источника микроРНК было решено использовать плазму. Для нормировки результатов амплификации используется синтетическая микроРНК-39 *Caenorhabditis elegans*, одинаковые количества которой добавляются к равным объемам плазмы перед выделением. Для определения абсолютных уровней микроРНК была выбрана методика ПЦР в реальном времени, которая обеспечивает высокую чувствительность и специфичность детекции исследуемых мишеней, а также характеризуется большим динамическим диапазоном. Основными параметрами работы системы количественного определения уровней микроРНК на базе ПЦР в реальном времени являются эффективность системы ревертирования, эффективность этапа амплификации, наличие линейной зависимости между логарифмом концентрации матрицы и номером цикла на котором репортерная флуоресценция совпадает с пороговым значением, а также минимальный предел чувствительности системы детекции. Все эти характеристики будут определяться с помощью анализа стандартной кривой построенной по результатам амплификации серийных разведений

матрицы РНК. Абсолютные количества мишени будут вычислены с помощью анализа стандартной кривой, построенной по результатам амплификации серийных разведений известных количеств синтетической микроРНК идентичной исследуемой.

Анализ данных литературы позволил выбрать конкретные микроРНК-мишени экспрессирующиеся в кардиомиоцитах и претендующие на роль специфичных биомаркеров повреждения миокарда. К ним относятся микроРНК-1, -133а, -208а, и -499. МикроРНК-1 и микроРНК-133а экспрессируются в составе одной транскрипционной единицы, но имеют отчасти противоположные функции и, таким образом, участвуют в тонкой согласованной регуляции пролиферации и дифференцировки мышечных клеток. МикроРНК-208а и микроРНК-499 кодируются интронами генов миозинов МҮН6 и МҮН7b, соответственно. Эти микроРНК транскрибируются в составе генов миозинов и регулируют соотношение МҮН6 и МҮН7b, что в свою очередь определяет работу сердечной мышцы.

Все задачи научно-исследовательской работы успешно решены. Разработаны методики сбора биоматериала, пробоподготовки и исчерпывающего удаления гепарина из образцов РНК. Разработана методика количественного анализа абсолютных уровней циркулирующих микроРНК. Определена динамика изменения уровней циркулирующих микроРНК у пациентов в ходе операций по аорто-коронарному шунтированию в условиях искусственного кровообращения и в послеоперационном периоде. Выявлены микроРНК, претендующие на роль специфичных биомаркеров интраоперационного повреждения миокарда. Разработанные методики могут применяться для экспресс оценки ишемического/реперфузионного повреждения миокарда на базе измерения абсолютных уровней циркулирующих микроРНК.

Публикации по теме НИР:

Статьи:

1. Федоров А., Минасян С., Костарева А., Кабанов В., Галагудза М., Курапеев Д. Повышение уровня микроРНК-208а в цельной крови после ишемии-реперфузии

миокарда у крыс // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. - №2. – с. 66-71.

2. Федоров А., Костарева А., Галагудза М., Курапеев Д. Перспективы использования микроРНК в качестве биомаркера ишемического повреждения миокарда // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. - №3. – с. 69-75.

Тезисы докладов:

1. Гайнуллина А.Н., Кондратов К.А., Минасян С.М., Галагудза М.М., Федоров А.В. Экспрессия микроРНК в ранней фазе ответа миокарда на ишемическое повреждение // Материалы международной научно-практической конференции «Неделя науки СПбГПУ». Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбГПУ. – 2014. в печати.

Информация об участии в конференциях и конгрессах по теме НИР:

1. Устный доклад на Международной конференции «Неделя науки 2014», Санкт-Петербург, СПбГПУ, 1-6 декабря 2014. Гайнуллина А.Н., Кондратов К.А., Минасян С.М., Галагудза М.М., Федоров А.В. Экспрессия микроРНК в ранней фазе ответа миокарда на ишемическое повреждение // Материалы международной научно-практической конференции «Неделя науки СПбГПУ». Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбГПУ. – 2014. в печати.