

Разработка персонифицированных подходов к оценке риска тромбозов и эффекта антитромботической терапии у больных с осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний и в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ)

Актуальность исследования

В основе большинства осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы и неудач репродуктивных технологий лежит повышенное тромбообразование, реализующееся в виде артериальных, внутрисердечных и венозных тромботических событий, потери беременности. В рамках предиктивной медицины изучены некоторые генетические нарушения, предрасполагающие к тромбозам, однако значение их до конца не определено, а функциональные или молекулярные маркеры, позволяющие диагностировать повреждение эндотелия с неизбежным исходом в тромбоз, не разработаны. Все тромботические осложнения профилактируются и лечатся с помощью антитромботических препаратов, однако в ряде случаев эффект не достигается из-за индивидуальной чувствительности или неприверженности больного терапии. Персонифицированный подход, учитывающий состояние системы гемостаза, в том числе эндотелия, особенности лекарств, функцию путей выведения, а также организацию мониторинга, позволяет повысить эффективность и безопасность антитромботической фармакотерапии. Разработка такого подхода и оценка результатов его внедрения является актуальной задачей кардиологии и ангиологии, а также поддержания репродуктивного здоровья.

Научная платформа

Кардиология и ангиология, репродуктивное здоровье

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования — заместитель генерального директора по научно-лечебной работе ФБГУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Карпенко М.А.

Исполнители:

Институт сердца и сосудов

Институт молекулярной биологии и генетики

Институт экспериментальной медицины

Институт перинатологии и педиатрии

Биобанк

Кафедра клинической лабораторной диагностики и генетики

Ключевые слова

Тромбоз, маркеры повреждения эндотелия, микровезикулы, микроРНК, персонифицированная антитромботическая терапия, вспомогательные репродуктивные технологии

Цель проекта

Разработать модель персонифицированного подхода к развитию и прецизионному лечению тромбоза на основе молекулярно-генетических, биохимических, иммунологических маркеров и информационных технологий в составе полного цикла: моделирование повреждения эндотелия и выявление ранних маркеров в эксперименте, оценка эффектов антитромботической терапии и организация мониторинга больных с

Задачи проекта

1. Проанализировать морфологические, биохимические и молекулярно-генетические изменения в эндотелиоцитах поврежденной сосудистой стенки и в кровотоке на разных стадиях тромбообразования в моделях повреждения эндотелия у животных (крысы, мыши) и определить значимые ранние маркеры повреждения эндотелия и тромбообразования.
2. Исследовать ассоциацию факторов риска развития тромбоэмболических осложнений, молекулярно-генетических и функциональных маркеров активации тромбоцитов, плазменных реакций и повреждения эндотелия (пары miRNA-mRNA, микровезикулы, циркулирующие эндотелиальные клетки, исследования тромбообразования *in vitro* в потоке)
3. Создать диагностические панели персонифицированной оценки риска атеротромбоза и венозных тромбозов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также у женщин в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) как модели повреждения эндотелия
4. Разработать модель прецизионной антитромботической терапии на основе определения ее эффекта по молекулярно-генетическим и функциональным маркерам у больных с тромботическими осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний и женщин в программах ВРТ
5. Разработать научно-обоснованный 4П протокол (предиктивный, превентивный, персонализированный и партисипативный принципы) полного цикла антитромботической терапии у больных с осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний (острый коронарный синдром, хроническая ИБС, фибрилляция предсердий, венозные тромбоэмболические осложнения, модель повреждения эндотелия у женщин в программах ВРТ)

Ожидаемые результаты проекта

В результате проекта будут определены морфологические, биохимические и молекулярно-генетические маркеры ранних доклинических стадий повреждения эндотелия и тромбообразования. Для выявленных маркеров будут разработаны методы анализа, пригодные для использования в клинической лаборатории, и сформирована лабораторная панель для ранней диагностики тромбозов. Предполагается получение патента на изобретение.

Будет разработан 4П протокол полного цикла наблюдения за больными с тромботическими осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний и информационное обеспечение для ведения регистра таких больных с системой поддержки принятия решений. Планируется получение патента.

Будет разработан протокол ведения женщин в программах ВРТ с персонализированным подходом к назначению и оценке эффекта низко-молекулярных гепаринов.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Результаты, полученные в ходе выполнения проекта на экспериментальных моделях, могут служить обоснованием разработки новых лекарственных препаратов и оценки их эффективности. В практическом здравоохранении могут быть использованы для обоснования и раннего выявления предтромботических состояний, индивидуализации антитромботической терапии, при построении программы ведения больных высокого риска, организации пролонгированного мониторинга антитромботической терапии, работы антикоагулянтных кабинетов и центров тромбоза, школ работы с больными.

Описание предлагаемого научного исследования

Предполагаемое научное исследование направлено на решение крупной социально-значимой проблемы предупреждения и своевременной адекватной терапии осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, в основе которых лежит патологическое тромбообразование. На первом этапе исследования будет разработана модель повреждения эндотелия и тромбозов на животных (крысы и/или мыши). Впервые у модельных животных на разных стадиях формирования тромба будет производиться забор венозной крови для анализа количества циркулирующих эндотелиоцитов и микровезикул эндотелиального происхождения, а также для определения микроРНК в циркулирующих эндотелиоцитах и эндотелиальных микровезикулах. Одновременно у части модельных животных и в фонде Биобанка будут взяты образцы эндотелия поврежденного сосуда на разных стадиях формирования тромба и проанализированы как морфологические и биохимические, так и молекулярно-генетические (уровень экспрессии генов, регулирующих состояние сосудистой стенки и т.д.) изменения в клетках эндотелия. Морфологические, биохимические и молекулярно-генетические маркеры, которые покажут статистически значимые изменения в процессе формирования тромба, будут выбраны для второго этапа исследования.

На втором этапе для выбранных маркеров будут разработаны методы, пригодные к использованию в клинической лабораторной практике для анализа венозной крови пациентов. Для оценки применимости выявленных маркеров и разработанных методов будет выполнено исследование биологического материала (венозной крови) больных с высоким риском тромбообразования, пациентов с диагностированным тромбозом и лиц без тромботических эпизодов в анамнезе, в том числе из фонда Биобанка. Будет определена диагностическая информативность и аналитические параметры (аналитические и клинические чувствительность, специфичность, прогностическая значимость, диагностическая эффективность) определения выявленных ранних лабораторных маркеров тромбозов. В настоящее время не существует лабораторных маркеров для ранней диагностики тромбозов, особенно на доклинической стадии. D-димер является маркером поздних стадий тромбообразования, а именно фибринолитического расщепления уже сформировавшегося тромба, и имеет отрицательную прогностическую значимость для дифференциальной диагностики уже свершившегося тромбоза. Разработанная панель диагностики будет выполнена в сравнении с такими современными научными измерениями, как иммунологическое определение фибрин-мономерных комплексов и тест генерации тромбина. Кроме того для подтверждения диагностических характеристик разработанной панели в клинике будет использован метод оценки тромбообразования в потоке *in vitro* (технология T-TAS). Панель будет валидирована у больных на фоне приема антитромботических препаратов (антиагрегантов и антикоагулянтов) и в группе женщин, находящихся в программах ВРТ, как модели повреждения эндотелия при ретрохориальной гематоме и синдроме поликистозных яичников.

Оценка эффекта антитромботической терапии на основании созданной панели будет включена в программу долгосрочного наблюдения за больными, получающими антитромботическую терапию в рамках проекта сети антикоагулянтных кабинетов г.Санкт-Петербурга. Будет создана математическая модель и программа информационной поддержки научно-обоснованного транзакционного 4П протокола (предиктивный, превентивный, персонализированный и партисипативный принципы) полного цикла антитромботической терапии у больных с осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний (острый коронарный синдром, хроническая ИБС, фибрилляция предсердий, венозные тромбозы, тромбоэмболические осложнения, модель повреждения эндотелия у женщин в программах ВРТ). Будет оценена экономическая эффективность предложенного протокола.

Таким образом, определение ранних молекулярно-генетических маркеров тромбоза, разработка лабораторной панели для их анализа в клинической практике и научно-обоснованный прецизионный подход к ведению больных, получающих антитромботическую терапию, позволит решить актуальную задачу средствами, адекватными мировому состоянию медицинской науки в области системы гемостаза, и получить новый научно-технический результат, востребованный в клинической практике.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

- 1) Способом моделирования венозного тромбоза у экспериментальных животных (крысы и/или мыши) будет являться повреждение сосудистой стенки методом аппликации раствора FeCl_3 на поверхности изолированной вены, что приведет к снижению ее тромборезистентности.
- 2) Определение количества циркулирующих эндотелиоцитов и микровезикул эндотелиального происхождения будет проводиться с помощью проточного цитометра с использованием соответствующих флуоресцентно-меченых антител.
- 3) Выделение циркулирующих эндотелиоцитов и эндотелиальных микровезикул из венозной крови будет проводиться с помощью иммуномагнитной сепарации.
- 4) Анализ микроРНК будет проводиться с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.
- 5) Определение биохимических маркеров повреждения эндотелия будет проводится иммунологическими методами и с помощью вестерн-блота, анализ изменения уровня экспрессии – методом полимеразной цепной реакции в реальном времени и с помощью микрочиповой технологии.
- 6) Для апробации лабораторных методов анализа выявленных ранних лабораторных маркеров тромбоза будет использоваться биологический материал (венозная кровь – свежие образцы и образцы из фонда Биобанка) пациентов высокого риска тромбоэмболических осложнений (нарушения сердечного ритма, имеющие искусственные клапаны сердца, перенесшие венозные тромбозы и эмболии), проходивших обследование и лечение на базе СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова и лиц без тромботических эпизодов в анамнезе, давших информированное согласие на включение в данное исследование
- 7) Лабораторные функциональные методы: технология тромбообразования, измеренная в потоке с использованием Total Thrombus-Formation Analysis System® (T-TAS); фактор VIII (активность); фактор Виллебранда (антиген); D-димер; фибрин-мономер (метод имунотурбидиметрии с латексным усилением); антитела к кардиолипину, b2 гликопротеину 1, аннексину V.
- 8) Клинические метод наблюдения за больными.
- 9) Создание регистра больных, математическое моделирование и разработка информационной поддержки с системой принятия решений для индивидуализации антитромботической терапии.