

Циркулирующие микрочастицы в качестве эндогенных носителей нуклеиновых кислот при патогенезе воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы

Актуальность исследования

Циркулирующие нуклеиновые кислоты, в частности микроРНК и митохондриальная ДНК, являются актуальным источником новых биомаркеров различных заболеваний человека, так как их уровни быстро и значительно меняются в процессе развития патологий. Мембранные везикулы и рибонуклеопротеиновые комплексы выступают в качестве эндогенных носителей циркулирующих нуклеиновых кислот. Такие носители влияют на стабильность циркулирующих нуклеиновых кислот и их взаимодействие с клетками мишенями и, следовательно, определяют как фундаментальные принципы межклеточной сигнализации, так и технологии очистки и измерения уровней циркулирующих нуклеиновых кислот. Поэтому получение новой информации о свойствах носителей конкретных циркулирующих нуклеиновых кислот необходимо для разработки оптимальных технологий их очистки и количественного определения. Данные технологии позволят создать новые тест-системы и алгоритмы диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы человека.

Научная платформа

Инновационные фундаментальные технологии в медицине

Научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования - к.б.н., зав. НИЛ молекулярно-клеточных механизмов атеросклероза Института молекулярной биологии и генетики Федоров А.В.

Исполнители:

НИЛ молекулярной кардиологии Института молекулярной биологии и генетики

Группа клеточной биологии

Кафедра клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России

НИО сердечно-сосудистой хирургии

НИЛ высокотехнологичных методов лечения сердечной недостаточности

НИЛ патоморфологии

Ключевые слова

ишемия миокарда, воспаление, биомаркеры, технологии очистки биомолекул, циркулирующие нуклеиновые кислоты, внеклеточные везикулы, рибонуклеопротеиновые комплексы

Цель проекта

Проект направлен на определение и характеристику молекулярных носителей циркулирующих нуклеиновых кислот, разработку технологий очистки и количественного определения уровней циркулирующих мишеней и создание новых алгоритмов диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы.

Задачи проекта

1. С помощью анализа данных высокопроцессивных экспериментов предсказать молекулярные мишени, а именно конкретные циркулирующие нуклеиновые кислоты – микроРНК, а также, ядерную и митохондриальную ДНК, которые являются перспективными кандидатами на роль специфичных биомаркеров воспалительных и

- ишемических состояний сердечно-сосудистой системы, в частности ишемии, связанной атеросклеротическим поражением коронарных артерий, а также интраоперационной ишемии миокарда.
2. Провести валидацию предсказанных циркулирующих мишеней в плазме лабораторных крыс, представляющих экспериментальную модель исследуемых патологий, и в плазме пациентов
 3. Разработать протокол разделения плазмы на фракции содержащие разные типы носителей нуклеиновых кислот, а именно микровезикулы, экзосомы и белковые комплексы
 4. Определить молекулярные носители предсказанных циркулирующих мишеней в норме и при развитии исследуемых патологий
 5. Выполнить детальную характеристику размеров, морфологии и молекулярного состава внеклеточных везикул, а также молекулярного состава рибонуклеопротеиновых комплексов с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения, проточной цитофлуорометрии, а также комплекса современных биохимических методов, включающих иммуноокрашивание, иммунопреципитацию, вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени
 6. Разработать технологию очистки и количественного определения каждой из предсказанных циркулирующих мишеней с учетом свойств выявленных молекулярных носителей
 7. Определить чувствительности и специфичности каждой из предсказанных циркулирующих мишеней для выявления исследуемых патологий сердечно-сосудистой системы
 8. Разработать модель, описывающую механизмы экспорта из клеток предсказанных циркулирующих мишеней с учетом выявленных молекулярных носителей
 9. Разработать модель, описывающую регуляторный потенциал (в частности, способность активировать иммунный ответ и вызывать стерильную воспалительную реакцию) предсказанных циркулирующих мишеней с учетом выявленных молекулярных носителей
 10. Разработать алгоритм диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы на основе измерения циркулирующих нуклеиновых кислот и/или их молекулярных носителей.

Достигнутые результаты проекта

Все поставленные на первый год выполнения проекта успешно решены. По результатам биоинформатического анализа сформирован список конкретных предсказанных циркулирующих нуклеиновых кислот, которые являются перспективными биомаркерами воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы.

Создана технология удаления ингибиторов ферментативных реакций из образцов нуклеиновых кислот с последующим количественным определением уровней мишеней с помощью ПЦР в реальном времени. Получены данные об уровнях предсказанных циркулирующих мишеней в группах пациентов с исследуемыми патологиями. В рамках научно-исследовательской работы выполненной за первый год реализации проекта предсказаны конкретные микроРНК, а также фрагменты митохондриальной и ядерной ДНК, которые могут присутствовать в системе циркуляции. Создана технология удаления ингибиторов ферментативных реакций из образцов нуклеиновых кислот с последующим количественным определением уровней мишеней с помощью ПЦР в реальном времени. Данная технология открывает возможность для точного количественного анализа уровней циркулирующих нуклеиновых кислот в широком спектре образцов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, исследование которых до этого было невозможно из-за присутствия в них ингибиторов ферментативных реакций. Произведена валидация предсказанных циркулирующих мишеней, для этого получены экспериментальные данные об уровнях предсказанных циркулирующих мишеней в группах пациентов с

исследуемыми патологиями, определены различия в уровнях мишеней, между анализируемыми группами пациентов. Таким образом, полученные на первом этапе результаты заложили надежный фундамент и создали важные предпосылки успешной реализации следующих этапов настоящего научно-исследовательского проекта. На предстоящем этапе проекта запланировано определение молекулярных носителей (а именно микровезикул, экзосом или белковых комплексов) предсказанных циркулирующих мишеней; с помощью дифференциального центрифугирования образцы биологических жидкостей будут разделены на соответствующие фракции, фракции будут охарактеризованы с помощью биохимических методов, сканирующей электронной микроскопии и проточной цитометрии, из фракций будет выделена общая РНК, уровни предсказанных мишеней будут определены с помощью ПЦР в реальном времени, белковые партнеры предсказанных циркулирующих нуклеиновых кислот будут определены с помощью иммунопреципитации с последующей детекцией белков и нуклеиновых кислот с помощью вестерн-блоттинга и ПЦР в реальном времени. Будет создана технология очистки и количественного определения каждой из предсказанных циркулирующих мишеней с учетом выявленных молекулярных носителей; данная методика позволит выполнять обогащение препарата предсказанными нуклеиновыми кислотами, что повысит чувствительность и специфичность соответствующего молекулярного биомаркера. Будет произведено экспериментальное определение чувствительности и специфичности каждой из предсказанных циркулирующих мишеней в очищенной фракции для выявления исследуемых патологий сердечно-сосудистой системы. Таким образом, в качестве конкретных конечных результатов будут (1) получены данные о молекулярных носителях предсказанных циркулирующих мишеней в группах пациентов с исследуемыми патологиями, их детальная молекулярная характеристика, а также данные об уровнях циркулирующих мишеней, взаимодействующих с каждым их типов носителей, (2) создан протокол технологии получения фракций мембранных везикул, очистки рибонуклеопротеиновых комплексов, и количественного определения уровней циркулирующих нуклеиновых кислот, (3) получены данные о чувствительности и специфичности каждой из предсказанных циркулирующих мишеней.

Ожидаемые результаты проекта

В результате выполнения проекта будут получены уникальные научные результаты, расширяющие фундаментальные знания о патогенезе и развитии воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы. Практическими результатами проекта будет являться создание технологий обогащения, очистки и количественного определения циркулирующих нуклеиновых кислот, а также разработка алгоритма диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы на основе измерения циркулирующих нуклеиновых кислот и/или их молекулярных носителей.

1. Будут предсказаны молекулярные мишени, а именно конкретные циркулирующие нуклеиновые кислоты – микроРНК, а также, ядерная и митохондриальная ДНК, которые являются перспективными кандидатами на роль специфичных биомаркеров воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы.
2. Будет произведена валидация предсказанных циркулирующих мишеней в плазме лабораторных крыс и в плазме пациентов.
3. Будет разработан протокол разделения плазмы на фракции содержащие разные типы носителей нуклеиновых кислот, а именно микровезикулы, экзосомы и белковые комплексы
4. Будут определены молекулярные носители предсказанных циркулирующих мишеней в норме и при развитии исследуемых патологий
5. Будет выполнена детальная характеристика размеров, морфологии и молекулярного состава внеклеточных везикул, а также молекулярного состава рибонуклеопротеиновых комплексов, в том числе будет разработан протокол анализа фракций микровезикул и

экзосом с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения, а также протокол анализа фракций микровезикул и экзосом с помощью проточной цитофлуорометрии

6. Будет разработана технология очистки и количественного определения каждой из предсказанных циркулирующих мишеней с учетом свойств выявленных молекулярных носителей, в том числе будет разработан протокол коммунопреципитации микроРНК антителами против белка Ago2.

7. Будут определены чувствительности и специфичности каждой из предсказанных циркулирующих мишеней для выявления исследуемых патологий сердечно-сосудистой системы

8. Будет разработана модель, описывающая механизмы экспорта предсказанных циркулирующих мишеней с учетом выявленных молекулярных носителей

9. Будет разработана модель, описывающая регуляторный потенциал (в частности, способность активировать иммунный ответ и вызывать стерильную воспалительную реакцию) предсказанных циркулирующих мишеней с учетом выявленных молекулярных носителей

10. Будет разработан алгоритм диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы на основе измерения циркулирующих нуклеиновых кислот и/или их молекулярных носителей.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Результаты исследования позволяют определить конкретные циркулирующие нуклеиновые кислоты, которые являются перспективными биомаркерами воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы, установить и провести молекулярную характеристику их эндогенных носителей. Данные результаты имеют фундаментальное значение для понимания молекулярных механизмов повреждения клеток сердечно-сосудистой системы, поскольку свойства выделяемых носителей позволяет сделать выводы о происходящих в системе клеточных процессах. Также результаты исследования необходимы для понимания регуляторного потенциала циркулирующих кислот в процессе передачи сигнала от областей подвергавшихся ишемии в другие районы, в частности, способности активировать иммунный ответ и вызывать стерильную воспалительную реакцию.

Кроме этого, результаты исследования имеют важные прикладные применения. Так, в ходе выполнения проекта будет разработан ряд методик, а именно получение фракций мембранных везикул, очистка рибонуклеопротеиновых комплексов, количественное определение уровней циркулирующих нуклеиновых кислот, в результате чего будут созданы оптимальные технологии очистки и количественного определения циркулирующих нуклеиновых кислот. Используя созданные технологии и опираясь на полученные экспериментальные данные об уровнях циркулирующих нуклеиновых кислот и их носителей, будет разработан алгоритм диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы.

Внедрение результатов проекта может быть произведено посредством использования созданных технологий и алгоритмов для разработки новых, а также повышения чувствительность и специфичность существующих диагностических тест-систем патологий сердечно-сосудистой системы. Кроме этого, полученные результаты могут быть использованы для усовершенствования протоколов защиты клеток сердечно-сосудистой системы от повреждений.

Описание научного исследования

Предлагаемое научное исследование направлено на разработку технологий очистки и количественного определения уровней циркулирующих нуклеиновых кислот, создание на базе этих технологий новых алгоритмов диагностики воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы, а также решение крупной научной проблемы связанной с фундаментальными принципами межклеточной сигнализации при повреждении клеток сердечно-сосудистой системы.

Результаты, которые могут быть получены в результате реализации исследований по заявленной теме, безусловно, имеют важное значение для развития здравоохранения, так как предоставят информацию о биомаркерах и потенциальных терапевтических мишенях для диагностики и лечения заболеваний, являющихся ведущей причиной смертности и инвалидности в мире.

Циркулирующие нуклеиновые кислоты являются предметом активных исследований в области поиска новых биомаркеров и регуляторов патологических состояний человека. Однако, лишь в последние годы в мировой медицинской науке появляются данные о важной диагностической и регуляторной роли взаимодействия циркулирующих нуклеиновых кислот с конкретным типом эндогенных носителей. В мировой научной литературе отсутствуют данные о том, с какими конкретно эндогенными молекулярными носителями связаны циркулирующие нуклеиновые кислоты, уровни которых меняются в ходе развития воспалительных и ишемических состояний сердечно-сосудистой системы. Коллектив владеет всем комплексом биохимических, молекулярно-биологических и биоинформатических методик, которые необходимы для реализации поставленных задач. В рамках научно-исследовательской работы выполненной за первый год реализации проекта предсказаны конкретные микроРНК, а также фрагменты митохондриальной и ядерной ДНК, которые могут присутствовать в системе циркуляции. Создана технология удаления ингибиторов ферментативных реакций из образцов нуклеиновых кислот с последующим количественным определением уровней мишеней с помощью ПЦР в реальном времени. Данная технология открывает возможность для точного количественного анализа уровней циркулирующих нуклеиновых кислот в широком спектре образцов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, исследование которых до этого было невозможно из-за присутствия в них ингибиторов ферментативных реакций. Получены экспериментальные данные об уровнях предсказанных циркулирующих мишеней в группах пациентов с исследуемыми патологиями, определены различия в уровнях мишеней, между анализируемыми группами пациентов. Таким образом, полученные на первом этапе результаты заложили надежный фундамент и создали важные предпосылки успешной реализации настоящего научно-исследовательского проекта.

На предстоящем этапе проекта запланировано определение молекулярных носителей предсказанных циркулирующих мишеней, а также определение уровней циркулирующих мишеней, взаимодействующих с каждым их типов носителей. Также на предстоящем этапе будет создана технология очистки и количественного определения предсказанных циркулирующих мишеней с учетом выявленных молекулярных носителей; данная технология позволит выполнять обогащение препарата предсказанными нуклеиновыми кислотами, что повысит чувствительность и специфичность соответствующего молекулярного биомаркера. Будет произведено экспериментальное определение чувствительности и специфичности каждой из предсказанных циркулирующих мишеней в очищенной фракции для выявления исследуемых патологий сердечно-сосудистой системы.

Таким образом, планируемый этап научного исследования необходим для создания новой технологии очистки и количественного определения циркулирующих нуклеиновых кислот, а также для получения уникального научного результата о свойствах молекулярных носителей предсказанных мишеней и их специфичности и чувствительности в качестве биомаркеров. Планируемый этап научного исследования актуален так как в ходе его выполнения будут получены прорывные научно-технические результаты соответствующие мировому уровню и востребованные в области молекулярной диагностики и терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

Для решения задач проекта используется комплекс современных биоинформатических подходов, биохимических и молекулярно-биологических методов, а также животные

модели патологий сердечно-сосудистой системы, в частности ишемии-реперфузии миокарда, и анализ клинической информации. В частности, с помощью дифференциального центрифугирования производится получение фракций микровезикул, экзосом и рибонуклеопротеиновых комплексов из плазмы крови. С помощью проточной цитофлуорометрии и иммуноблоттинга изучаются популяции внеклеточных везикул несущих определенные маркеры типов клеток и процессов. С помощью иммунопреципитации производится дополнительная характеристика и очистка эндогенных молекулярных носителей. С помощью ПЦР в реальном времени производится количественное определение уровней циркулирующих нуклеиновых кислот в составе различных типов носителей, а также анализируется их изменение при развитии патологий. Характеристика морфологии внеклеточных везикул производится с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Для анализа и определения количественных характеристик распределения внеклеточных везикул по размерам применяется метод динамического светорассеяния. Для предсказания молекулярных мишеней будут использоваться данные высокопроцессивных экспериментов и алгоритмы кластерного анализа и анализа обогащения.