

Projekt „WPŁYW PROFILU MOLEKULARNEGO EGZOSOMÓW NA PATOMECHANIZM KARDIOMIOPATII CUKRZYCOWEJ”

lek. Miłosz Majka – kierownik Projektu, doktorant w Katedrze i Zakładzie Biochemii,

dr hab. Małgorzata Czystowska-Kuźmich – opiekunka merytoryczna projektu, Pracownia Mikropęcherzyków, Katedra i Zakład Biochemii,

dr Katarzyna Czarzasta – opiekunka pomocnicza projektu, Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej

Wprowadzenie

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) są obecnie jednymi z najbardziej intensywnie badanych cząsteczek pozakomórkowych jako potencjalne biomarkery chorób. Jako EVs określamy obłonione struktury o różnym pochodzeniu, rozmiarze i mechanizmach powstawania. Możemy je porównać do przesyłek pocztowych, które przez transfer białek, lipidów i kwasów nukleinowych wpływają na komunikację między komórkami i pozwalają na wgląd w ich stan metaboliczny.

W projekcie realizowanym w Katedrze i Zakładzie Biochemii, we współpracy z Zakładem Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej oraz Kliniką Diabetologii i Chorób Wewnętrznych UCK WUM badamy znaczenie EVs w rozwoju powikłań cukrzycy typu 2 oraz ich potencjalne zastosowanie w diagnostyce i terapii. W ciągu ostatnich 35 lat liczba chorych na cukrzycę zwiększyła się na świecie ponad 3,5-krotnie, a w Polsce wynosi ona ponad 3 miliony pacjentów. Narastająca epidemia cukrzycy implikuje wzrost liczby chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. Stan przedcukrzycowy i cukrzyca zwiększają ryzyko rozwoju lub nasilenia objawów niewydolności serca, która występuje u ok. 30% pacjentów leczących się z powodu cukrzycy. Zmiany w mikrokrążeniu spowodowane dysfunkcją śródbłonna w przebiegu cukrzycy indukują niedotlenienie komórek mięśnia sercowego, co prowadzi do zwłóknienia śródtkankowego oraz przebudowy komórek naczyń i serca. Badania obserwacyjne i przedkliniczne



Zespół badawczy realizujący projekt „Wpływ profilu molekularnego egzosomów na patomechanizm kardiomiopatii cukrzycowej” pod kier. lek. Miłosza Majki (pierwszy z lewej)

wskazują na możliwość rozwoju niewydolności serca pod postacią kardiomiopatii cukrzycowej, która cechuje się brakiem towarzyszących czynników ryzyka, jak nadciśnienie tętnicze czy choroba wieńcowa.

Opis projektu

Obecny obraz cukrzycy wykracza poza tradycyjne postrzeganie hiperglikemii jako głównego problemu tej choroby, a najnowsze wytyczne światowych towarzystw wskazują na odrębną grupę pacjentów, u których akcent w leczeniu powinien być postawiony na redukcję powikłań, w tym na kardioprotekcję. Poznanie czynników molekularnych, które przemawiają za zwiększonym ryzykiem rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów, przyczyni się do lepszej

diagnostyki i opracowania personalizowanej terapii od wczesnych etapów leczenia. Uważamy, że zmiany w profilu molekularnym EVs, i zaburzona komunikacja międzykomórkowa z ich udziałem, mogą być nie tylko ważnym elementem rozwoju zaburzeń funkcji komórek serca, ale także posłużyć do diagnostyki i oceny ryzyka powikłań.

Oczekiwane korzyści z projektu

Obecne na błonie EVs markery oraz skład molekularny zależny od ich pochodzenia sprawiają, że stanowią one wgląd w stan metaboliczny komórek. Monitorowanie zmian w profilu molekularnym EVs może być wykorzystane do śledzenia progresji i diagnostyki chorób w tzw. płynnej biopsji. Naszym celem jest zbadanie

przydatności EVs w ocenie metabolizmu komórek w cukrzycy typu 2. Ponieważ szczególną rolę w rozwoju tej choroby odgrywają zaburzenia metaboliczne i nadmiar tkanki tłuszczowej, opracowywane przez nas metody mają pozwolić na izolację z osocza EVs, pochodzących z tej tkanki, a następnie zbadanie zmian w ich profilu molekularnym metodami proteomiki i transkryptomiki.

W projekcie poświęcamy główną uwagę tytułowemu egzosomom, czyli EVs pochodzącym z układu endosomalnego komórki, reprezentujących populację małych EVs o wielkości poniżej 200 nm., jednakże planujemy zbadanie także innych podtypów. Coraz większą uwagę zwraca się na duże EVs o wielkości powyżej 200 nm. oraz ich znaczenie w patofizjologii i diagnostyce różnych chorób. Różnice między tymi populacjami EVs były dotychczas pomijane przez badaczy w wyniku trudności w dokładnej separacji cząsteczek. Optymalizacja metod izolacji EVs w kierunku większej specyficzności wiąże się z wieloma wyzwaniami na różnych etapach projektu. Pierwszym jest usprawnienie metod izolacji EVs, które pozwolą na sprawną separację ich podtypów oraz oczyszczenie od pozakomórkowych cząsteczek nieobłonionych, takich jak lipoproteiny. Następnym wyzwaniem będzie wykrycie różnic w ekspresji cząsteczek, które mogą być obecne w EVs w zaledwie pojedynczej kopii. Są to m.in.

cząsteczki microRNA – krótkich, niekodujących kwasów nukleinowych wpływających na regulację ekspresji genów. Badania te są możliwe dzięki wdrażanym przez zespół dr hab. Małgorzaty Czystowskiej-Kuźmich metodami transkryptomiki, proteomiki oraz metabolomiki, realizowanymi dzięki współpracy z ośrodkami w kraju i za granicą. Pozwalają one poznać fenotyp biologiczny EVs z ogromną dokładnością, jednak wymagają bardzo uważnego przygotowania próbek i implikują ogromną ilość danych bioinformatycznych do opracowania. Wymaga to stosowania innowacyjnej aparatury oraz oprogramowania i zoptymalizowanych metod ekstrakcji pożądanych cząsteczek. Wyzwanie stanowi także analiza funkcji EVs w modelu *in vitro*, w którym badamy ich wpływ na zaburzenia funkcji komórek śródbłonna naczyń i komórek mięśnia sercowego. Naprzeciw temu wyzwaniu wychodzą nowe techniki opracowywane przez zespół. Nie sposób nie wspomnieć w tym miejscu o ogromnym udziale studentów z SKN EVIONA pod przewodnictwem Jakuba Tomaszewskiego. W ramach realizowanego przez nich grantu z programu „SKN Tworzą Innowacje” MNiSW, studenci SKN EVIONA są ogniwem współpracy z Środowiskowym Laboratorium Laserych Techniek Mikroskopowych IMDiK, w ramach której opracowywany jest nowy protokół obrazowania EVs przy pomocy inżynierii genetycznej i mikroskopii konfo-

kalnej. Liczne współprace z zespołami z całego świata oraz mulitdyscyplinarny zespół, z wiedzą i doświadczeniem nie tylko biologiczno-technicznym, ale również klinicznym, pozwalają nam realizować zadania i tworzyć innowacyjne rozwiązania w obszarze biotechnologicznym. Jednym z naszych założeń jest automatyzacja procesów izolacji i analizy EVs, co jest kluczowe dla ich przyszłego zastosowania w warunkach klinicznych. Dlatego realizowany przez nas projekt ma na celu nie tylko scharakteryzowanie zmian w profilu EVs i zbadanie ich roli w rozwoju niewydolności serca w cukrzycy, ale także opracowanie nowatorskich metod, które będą krokiem w kierunku implementacji rozwiązań w diagnostyce klinicznej i rozwoju zastosowania EVs jako płynnej biopsji w chorobach cywilizacyjnych.

Skład zespołu projektowego

Projekt jest finansowany ze środków Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Perły Nauki”. Realizowany będzie przez zespół badaczy w składzie: lek. Miłosz Majka – Doktorant w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Kierownik Projektu; dr hab. Małgorzata Czystowska-Kuźmich – Kierownik Pracowni Mikropęcherzyków i Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Opiekunka Merytoryczna Projektu; dr Katarzyna Czarzasta – Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Opiekunka Pomocnicza Projektu. ■