



Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 18010 – Конкурсна сесия 2018:

„Идентифициране на биомаркери от ново поколение за диагностична оценка на активността и проследяване на пациенти със системен лупус еритематодес“

РЪКОВОДИТЕЛ: Доц. Мария Атанасова Раданова, дб

Системният лупус еритематодес (СЛЕ) е автоимунно заболяване, с широкоспектърни органни прояви, множество автоантитела и многофакторна имунологична патогенеза. При 25%–50% от случайно подбрани пациенти със СЛЕ се установяват клиничко-лабораторни данни за лупусен нефрит (ЛН) към момента на поставянето на СЛЕ като диагноза, а около 60% от възрастните пациенти със СЛЕ развиват нефропатия по-късно в хода на автоимунното заболяване. ЛН е една от най-сериозните, значими и чести прояви на СЛЕ. Конвенционалните лабораторни маркери за диагностика и оценка на активността на заболяването се характеризират с ниска чувствителност и специфичност по отношение на ролята им при проследяване на ЛН. Това налага също да се разшири серумния мулти-панел от биомаркери при ЛН. През последните години прилагането на по-напреднали технологии за скрининг като генната експресията, микроарей технологията и дълбокото секвениране откриха нови категории от биомаркерите, като циркулиращите в кръвта не-протеин-кодиращи ендогенни РНК-и (non-coding RNAs, ncRNAs). Сред тях дълговерижните некодиращи РНКи (lncRNAs) изглежда имат потенциал за по-добра диагностична точност. lncRNAs участват в патогенезата на имуно-медицирани възпалителни заболявания като ревматоиден артрит, автоимунен тиреоидит и СЛЕ. Това ги прави подходящи таргети за терапия и дава възможност да бъдат проучени като потенциални биомаркери за ранна диагностика и оценка на активността при СЛЕ и ЛН.

Затова и целта на настоящото научно изследване е идентифициране на биомаркери от ново поколение за диагностична оценка на активността и проследяване на пациенти със системен лупус еритематодес (СЛЕ).

За реализирането на поставената цел са планирани следните изследователски задачи:

1. Подбор на СЛЕ пациенти със и без лупусна нефропатия за включване в групи с характерна клинична изява на заболяването;

2. Подбор на здрави доброволци за контролна група; изолиране на тотална РНК от кръв на пациенти и здрави контроли;
3. Оформяне на сборни пулове от РНК-и за дълбоко секвениране;
4. Анализ на нивата на експресия на отделни дълги некодиращи РНК-и (long non-coding RNAs, lncRNAs) в плазмата при СЛЕ пациентите във връзка с: наличие или отсъствие на лупусна нефропатия; различна клинично-лабораторната активност на лупусния нефрит; нива на класически маркери за оценка на активността на лупусния нефрит.

В резултат от реализирането на настоящото проектно предложение се очаква получаване на нови данни за потенциални:

1. диференциални и диагностични биомаркери при СЛЕ и лупусен нефрит;
2. потенциални прогностични маркери за лупусен нефрит;
3. потенциални нови биомаркери за активност на заболяването с относителна самостоятелност за проследяване на СЛЕ.

Постигнати резултати: В резултат от извършените дейности, заложи в проекта, бяха подбрани пациенти със СЛЕ с лупусна нефропатия по предварително дефинирани критерии. Оформени бяха следните три групи:

1. Пациенти в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия;
2. Пациенти в състояние на частична клинично-лабораторна ремисия;
3. Пациенти в състояние на активен лупусен нефрит.

За нуждите на изследването бяха привлечени 8 на брой клинично здрави лица (всички жени) на средна възраст 41 г. След получаване на информирано съгласие им беше взета кръвна проба за изолиране на тотална РНК.

От всички подбрани пациенти и здрави контроли беше екстрахирана тотална РНК. Беше оптимизиран и апробиран от екипа на проекта протокол, позволяващ изолиране в по-голяма концентрация на тотална РНК от плазма. Количеството и качеството на получената от всяка проба РНК бяха оценени като годни за последващите анализи.

Бяха оформени 4 пула от тотална РНК. Във всеки пул беше включена РНК от пет пациента/ здрави контроли от следните категории:

1. Пациенти със СЛЕ без лупусна нефропатия;
2. Пациенти с биопсично доказана лупусна нефропатия в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия;
3. Пациенти с биопсично доказана лупусна нефропатия в активно състояние;

4. Здрави контроли.

Количеството на тоталната РНК във всеки от изготвените за секвениране пулове беше над 2 µg и покриваше изискванията на LC Science, Хюстън, САЩ за проби, подходящи за секвениране.

Секвенирането на подготвените проби беше извършено от LC Science, Хюстън, САЩ. В резултат от биоинформатичния анализ бяха получени данни за наличие на три lncRNAs – lncAB599.1, lncAB599.2 и lncAB371.6 в сборния пул от пациенти с активен лупусен нефрит. Тези lncRNAs са нови и неизследвани. Бяха идентифицирани само в една базата данни – NCBI, като диференциално експресирани в макрофаги, третирани с IL-27.

Резултатите на този етап показват, че вероятно тези три lncRNAs биха могли да разграничават здрави лица от пациенти със СЛЕ, както и пациенти с активен лупусен нефрит от пациенти в ремисия или със СЛЕ без бъбречно засягане. За да се докаже тази хипотеза е необходимо валидиране на експресията на lncAB599.1, lncAB599.2 и lncAB371.6 с qPCR в по-голяма кохорта пациенти в сравнение със здрави контроли. Тази дейност е планирана за бъдеща научноизследователска работа на екипа. Валидирането на тези lncRNAs ще даде възможност за търсене на взаимовръзки между нивата им и събраната за пациентите клинична информация.

Обобщена е и критично представена наличната в литературата информация за ролята на вид lncRNAs – т. нар. кръгови РНК-и (circular RNAs, circ-RNAs), като нови биомаркери при СЛЕ. Обзорната статия е публикувана в реферирано и индексирано в световните бази данни Web of Science и PubMed списание.

Финализиран е дисертационен труд на зачислен докторант в редовна форма на докторантура при Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, МУ-Варна.