

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) to małe pęcherzyki wytwarzane przez komórki eukariotyczne i prokariotyczne, otoczone dwuwarstwową błoną i transportujące wiele bioaktywnych cząsteczek. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na ich istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej, regulacji epigenetycznej i możliwości zastosowania w diagnostyce i terapii. Izolacja i rozdzielanie EV zwykle obejmuje złożone i wieloetapowe procedury, które skutkują otrzymaniem niejednorodnej frakcji EV o nieznanym pochodzeniu. Nakładający się zakres rozmiaru EV, podobna morfologia i zmienny skład chemiczny stanowią wyzwanie dla precyzyjnego rozdzielania subpopulacji EV. Nowe metody analityczne do izolacji, rozdzielania i charakteryzowania EV są niezbędne, aby rzucić światło na ich różnorodność strukturalną, role fizjologiczne i patologiczne oraz przyszłe zastosowania diagnostyczne i terapeutyczne.

Celem tego projektu jest zbadanie możliwości wynikających z zastosowania jedno- i dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) do izolacji i frakcjonowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Solidne i wydajne techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, zwłaszcza łączone ze spektrometrią mas, mogą przyspieszyć podstawowe badania i kontrolę jakości preparatów leków zawierających EV.

W ramach projektu planowane jest i) opracowanie nowej metody HPLC opartej na chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC) do efektywnej izolacji i separacji subpopulacji EV; ii) opracowanie metody z użyciem dwuwymiarowej chromatografii cieczowej wykorzystującej dwa z trzech ortogonalnych trybów separacji opartych na hydrofobowości, wielkości i właściwościach jonowych do kompleksowej separacji frakcji EV; iii) opracowanie metody LC-Q-TOF do badania składu lipidowego frakcji EV. Do opracowania metody jako próbki biologiczne zostaną wykorzystane EV pozyskane z ludzkiej surowicy i komórek cyjanobakterii. Frakcje subpopulacji EV zostaną scharakteryzowane za pomocą najnowocześniejszych technik, takich jak mikroskopia elektronowa, western blot i analiza śledzenia nanocząstek, przez współpracujących ekspertów.

Główną innowacją projektu jest wprowadzenie i ocena możliwości zastosowania nowego mechanizmu rozdzielania do izolacji EV. W chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC), subpopulacje EV zostaną rozdzielone na podstawie różnic w składzie lipidów błonowych, a tym samym ich biogenezy – co obecnie nie jest możliwe za pomocą konwencjonalnych metod stosowanych w badaniach EV. Zastosowanie HIC to nowa koncepcja oddzielania natywnych EV w oparciu o różnice w hydrofobowości ich błon. Potencjalne różnice w składzie lipidowym populacji EV mogą umożliwić ich szybkie i dogodne rozdzielanie i izolację. Oceniona zostanie również zdolność HIC do oddzielania EV od innych składników ludzkiej surowicy.

W kolejnym etapie projektu planowane jest zwiększenie zdolności rozdzielczej metody 1D-LC HIC, poprzez wdrożenie techniki 2D-LC, co pozwoli na szczegółowy wgląd w heterogeniczność populacji EV i nie jest obecnie możliwe przy stosowaniu konwencjonalnych metod. Kombinacje trybów chromatograficznych zostaną przetestowane w celu oceny i porównania rozdzielczości trybów 1D i 2D w analizie subpopulacji EV. Rozdzielczość opracowanych metod zostanie porównana z powszechnie stosowanymi metodami, takimi jak ultrawirowanie.

Dodatkowo frakcje EV uzyskane podczas jedno- i dwuwymiarowych analiz LC zostaną przeanalizowane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas w celu zbadania dokładnego składu lipidów otrzymanych subpopulacji EV. Ponieważ skład lipidowy EV i ich funkcja biologiczna pozostają stosunkowo niejasne, bardzo ważne jest dostarczenie narzędzi umożliwiających analizę lipidomiczną poszczególnych subpopulacji EV.

Opracowane w ramach tego projektu metody izolacji, rozdzielania i charakteryzacji EV przyczynią się do uzyskania głębszego wglądu w skład i biologię EV, stając się dobrze ugruntowanymi i szeroko stosowanymi metodami izolacji i rozdzielania subpopulacji EV.