УДК 617.764-07
©Коллектив авторов

ЭКЗОСОМЫ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ: ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ

А.Е. Григорьева[1†], С.Н. Тамкович[1,3†], А.В. Еремина[2], А.Е. Тупикин[1], М.Р. Кабилов[1], В.В. Черных[2], В.В. Власов[1], П.П. Лактионов[1], Е.И. Рябчикова[1]*

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; тел.: 8(383)3635163; факс: 8(383)3635153;
эл. почта: lenryab@yandex.ru
[2]Новосибирский филиал "Межотраслевой научно-технический комплекс
"Микрохирургия глаза" имени ак. С.Н. Федорова", Новосибирск
[3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Экзосомы – тип внеклеточных везикул, являющихся переносчиками молекулярных сигналов в организме, а также несущих маркеры клеток-продуцентов. Целью данного исследования явилось выявление экзосом в слёзной жидкости (СЖ) здоровых людей, подтверждение их природы и изучение морфологических и молекулярно-биологических характеристик. Образцы СЖ однократно собирали у 24 здоровых доноров (45-60 лет), центрифугировали при 20000 g (15 мин) для осаждения клеточного дебриса. Супернатанты исследовали методом негативного контрастирования, а также использовали для выделения и очистки экзосом (ультрафильтрация через поры 100 нм, двойное ультрацентрифугирование (90 мин, 100000 g, 4°C). Полученные образцы исследовали методами электронной микроскопии и иммуноцитохимии, выделяли РНК и ДНК, определяли их размер капиллярным электрофорезом, определяли концентрацию и локализацию ДНК в экзосомах. Секвенирование ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina), данные анализировали с помощью CLC GW 7.5 (CLC Bio). Последовательности картировали на геном человека (hg19). Супернатант СЖ содержал клеточный детрит, сферические микрочастицы (20-40 нм) и везикулы, часть которых по размеру и морфологии соответствовала экзосомам. Препараты, полученные из СЖ путём ультрацентрифугирования и ультрафильтрации, содержали микрочастицы (17%), сферические и чашеобразные везикулы (40-100 нм, 83%), на поверхности которых иммуноцитохимически были выявлены специфические для экзосом маркеры (CD63, CD9 и CD24). Проведённое исследование показало, что в СЖ людей содержатся экзосомы в высокой концентрации, с которыми связаны РНК (размером менее 200 пар нуклеотидов) и геномная ДНК (размером 3-9 т.п.о.). Секвенирование ДНК показало, что около 92% прочтений (reads) картируются на геном человека.

Ключевые слова: слёзная жидкость, электронная микроскопия, внеклеточные везикулы, экзосомы, ДНК

DOI: 10.18097/PBMC20166201099

ВВЕДЕНИЕ

Экзосомы – внеклеточные везикулы, содержащие в своей полости разнообразные клеточные РНК и белки и окруженные мембраной, обогащённой холестеролом и сфинголипидами. Понимание роли экзосом как "визитной карточки" каждой клетки и переносчика молекулярных сигналов в организме, несомненно, является важнейшим достижением клеточной биологии последних лет. Экзосомы несут уникальные маркеры клеток-продуцентов [1, 2], что определяет интерес к этим структурам как к диагностическому субстрату. Экзосомы формируются путём впячивания внутрь мембраны мультивезикулярных телец (МВТ, поздних эндосом), захватывая при этом участок цитозоля, накапливаются в полости МВТ и высвобождаются из клеток при слиянии мембраны МВТ с плазмалеммой. Экзосомы найдены во всех исследованных жидкостях тела [3, 4], а их способность к адресной доставке молекулярных сигналов к клеткам-реципиентам служит основой для многочисленных исследований роли экзосом в функционировании организма и в патогенезе различных заболеваний [2, 5].

Заболевания органа зрения также привлекают внимание исследователей экзосом: показано их присутствие в водянистой влаге [6], а исследования экзосом, продуцирумых клетками трабекулярного аппарата глаза, установили присутствие в этих структурах маркеров глаукомы [7]. Экзосомы продуцируются пигментными клетками сетчатки в культуре, и авторы полагают, что они вовлечены в патогенез возрастной дегенерации макулы [8]. Слезная жидкость (СЖ), в отличие от остальных жидких и полужидких сред глаза, легко доступна для анализа, однако, исследования экзосом СЖ до сих пор не опубликованы. Между тем, экзосомы СЖ могут нести информацию о патологических процессах как на поверхности глаза (конъюктивиты различной природы, синдром "сухого" глаза и др.), так и в его "закрытых" структурах. Свидетельством способности СЖ отражать состояние органа зрения являются, в частности, изменения содержания цитокинов и специфических антител в СЖ при разных офтальмологических заболеваниях [9], а также рост содержания лизоцима в СЖ при диабетической ретинопатии [10].

* - адресат для переписки

Наши предварительные исследования ультраструктуры супернатантов СЖ пациентов с различными офтальмологическими заболеваниями показали, что СЖ является многокомпонентной системой, содержащей рыхлые агрегаты белков и разнообразные субмикроскопические структуры, включая везикулы [11], ряд которых по своим размерам соответствовал экзосомам.

Целью данного исследования было выделение экзосом из СЖ здоровых людей, подтверждение их природы и изучение морфологических и молекулярно-биологических особенностей экзосом и сопутствующих структур. Мы исследовали СЖ здоровых людей с помощью электронной микроскопии, выделили из СЖ внеклеточные везикулы, экзосомы и микрочастицы и показали присутствие в них РНК и фрагменты геномной ДНК.

МЕТОДИКА

Несмотря на активные исследования, в научной литературе отсутствуют общепринятые критерии идентификации и терминологии, касающиеся внеклеточных везикул, разновидностью которых являются экзосомы. Термин “экзосомы” до недавнего времени означал везикулы размером 40-100 нм, выделенные с помощью ультрацентрифугирования [12]. Исследования последних лет показали, что полученные таким образом образцы содержат не только экзосомы, но и другие структуры, присутствия которых невозможно избежать [13]. Термин “внеклеточные везикулы” был введён для обозначения всех везикул, выделяемых из биологических жидкостей, а использование термина “экзосомы” требует выполнения ряда условий, в частности, выявления специфических белков мечеными антителами [14]. В нашей работе использован термин “внеклеточные везикулы” для определения всех обнаруженных с помощью электронной микроскопии везикул, и термин “экзосомы” для обозначения везикул, меченных моноклональными антителами. Термин “микрочастицы” определяет компактные сферические структуры, не имеющие мембраны, размером 20-40 нм. Микрочастицы, внеклеточные везикулы и экзосомы объединяются термином “субмикроскопические структуры”.

Выделение субмикроскопических структур из слёзной жидкости

Слёзную жидкость (110-340 мкл) однократно собирали у 24 доноров (45-60 лет), не имеющих офтальмологических заболеваний (8 мужчин и 16 женщин). Возрастной диапазон был выбран в соответствии с периодом риска возникновения глаукомы. Мы модифицировали методику, описанную Sack и коллегами [15], и стимулировали слёзоотделение порошком альбуцида. На исследование было получено информированное согласие всех пациентов и разрешение комитета по биомедицинской этике Новосибирского филиала МНТК “Микрохирургия глаза”. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан.

Образцы СЖ центрифугировали (20000 g, 15 мин) для осаждения клеточного дебриса, 20 мкл супернатанта использовали для электронно-микроскопического исследования, оставшийся – для выделения экзосом. Индивидуальные образцы супернатантов СЖ (80-200 мкл) разводили 4 мл фосфатно-солевого буфера (ФБ) и фильтровали через фильтр Minisart high flow, 16553-K, Sartorius (диаметр пор 100 нм), который позволяет фильтровать при низком давлении и не повреждает структуры. Фильтрат центрифугировали (100000 g, 90 мин, 4°C), осадок ресуспендировали в 4 мл ФБ и вновь центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок ресуспендировали в 150 мкл ФБ и использовали для дальнейших исследований. Данный препарат в дальнейшем именуется “экзосомы”, в отличие от “супернатанта СЖ”.

Электронная микроскопия

Для негативного контрастирования образцы супернатанта СЖ и выделенных экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизованной углеродом, в течение 1 мин и 5-10 с контрастировали 0,5% раствором уранилацетата или 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК).

Для приготовления ультратонких срезов осадки, полученные при втором ультрацентрифугировании СЖ, фиксировали 4% раствором параформальдегида, дофиксировали 1% раствором четырёхокиси осмия, обезвоживали в растворах этилового спирта и ацетоне, заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Leica EM UC7 (“Leica”, Германия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца.

Для выявления специфических маркеров к 10 мкл суспензии экзосом добавляли 10 мкл 0,5% БСА/ФБ, вносили по 3 мкл (100 мкг/мл) моноклональных антител к рецепторам CD63, CD24 и CD9 (“Abcam”, Великобритания) и инкубировали в течение 18 ч на шейкере Elpan 358S, затем сорбировали на сетки. Далее сетки промывали ФБ и инкубировали 2 ч с конъюгатом белка А и наночастиц золота во влажной камере при комнатной температуре, затем промывали ФБ в течение 2 мин и контрастировали ФВК в течение 10 с.

Подготовленные разными методами сетки изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Veleta (“Olympus Corporation”, Япония). Размеры структур измеряли на мониторе цифровой фотокамеры с помощью программы iTEM (“Olympus Corporation”).

Выделение нуклеиновых кислот

РНК и ДНК СЖ здоровых людей выделяли, как рекомендовано производителями, с помощью наборов “*mir*Vana™ miRNA Isolation Kit” (“Ambion”,

США) и “DNA Isolation Kit” (“BioSilica Ltd.”, Россия), соответственно, используя 20-40 мкл образца экзосом. Выделенные нуклеиновые кислоты (НК) концентрировали переосаждением с триэтиламином и гликогеном, как описано ранее [16]. К 12 мкл образца добавляли 1 мкл ДНКазы I (1 ед акт/мкл, без РНКазной активности, “Fermentas”, США) и 1,45 мкл 10×буфера для ДНКазы, либо 1 мкл РНКазы А (10 ед акт/мкл, без ДНКазной активности, “Fermentas”) и 1,45 мкл 10×ТЕ буфера. После инкубации в течение 30 мин (37°С), ДНКазу ингибировали добавлением ЭДТА и прогреванием (65°С, 10 мин), затем НК переосаждали с триэтиламином и гликогеном.

Оценка концентрации и размера нуклеиновых кислот

Концентрацию экзосомной ДНК в СЖ определяли с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (М-ПЦР-РВ), специфичной к фрагментам повторяющихся последовательностей LINE-1 и α-сателлитного повтора, как описано ранее [16]. Для построения калибровочной кривой использовали геномную ДНК лейкоцитов здоровых доноров. М-ПЦР-РВ проводили на амплификаторе с оптическим модулем iCycler5 (“Bio-Rad”, США), данные анализировали с помощью программного обеспечения iQ5 (“Bio-Rad”). Поскольку в полученных после центрифугирования образцах было различное соотношение супернатанта и осадка, концентрация ДНК приведена на 1 мл исходной СЖ. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами (Statistica 6.0, MedCalc). Результаты представлены в виде среднего, стандартной ошибки среднего и доверительного интервала для $p<0,05$.

Размер экзосомной ДНК и РНК определяли с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies Inc.”, США) с использованием High Sensitivity DNA Kit и RNA 6000 Pico Kit.

ДНК 6 образцов здоровых людей элюировали в соответствии с методом, применяемым для удаления ДНК с поверхности клеток [17] или обрабатывали ДНКазой I (1 ед акт/мкл). Ферментативную обработку экзосом СЖ проводили следующим образом: к 460 мкл экзосом добавляли 8 мкл ДНКазы I и 52 мкл 10×буфера для ДНКазы (“Fermentas”), инкубировали в течение 30 мин (37°С), и ингибировали фермент, как описано выше. После обработки ДНКазой образец ультрацентрифугировали. Осадок и супернатант собирали для выделения ДНК с последующей оценкой концентрации и размера экзосомной ДНК методом капиллярного электрофореза, как описано выше. После элюции ДНК экзосомы осаждали ультрацентрифугированием, осадок и супернатант собирали для выделения ДНК с последующей оценкой её размера и концентрации.

Секвенирование ДНК

ДНК, выделенная из образцов экзосом, была обработана РНКазой А (10 ед. акт. фермента, 37°С, 30 мин), сконцентрирована переосаждением и фрагментирована с использованием Covaris S2 (“Covaris”, Австралия). Фрагментная библиотека была приготовлена с помощью Low Input Library Prep Kit (“Clontech”, США). Секвенирование проводили в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США), используя набор Reagent Kit v3 (2×300, “Illumina”). Полученные данные были проанализированы с помощью CLC GW 7.5 (“Qiagen”, США). Последовательности были отфильтрованы по качеству (ambiguous limit = 2, quality limit = 0,031) и картировались на геном человека (hg19) с параметрами, заданными по умолчанию. Некартировавшиеся прочтения (reads) использовали для сборки *de novo*, контиги с максимальным покрытием (>19) анализировали при помощи программы Blast, используя базу данных NCBI. Треки различных вариантов повторов были загружены с www.genome.ucsc.edu.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субмикроскопические структуры в супернатантах слезной жидкости

Исследование методом негативного контрастирования выявило в супернатантах СЖ клеточный детрит, микрочастицы, везикулы (пузырьки) и макромолекулярные агрегаты (белки и гликопротеины). Структура последних не отличалась от описанной нами ранее [11]. Компоненты клеточного детрита (40-250 нм) разнообразной формы имели однородную или зернистую структуру (рис. 1а). Округлые микрочастицы (20-40 нм), представляющие собой компактные плотные агрегаты макромолекул, составляли около 20% образца (рис. 1б,в). Многочисленные везикулы размером до 300 нм (рис. 1в-ж) были обнаружены во всех супернатантах СЖ, их содержимое было однородно и имело среднюю (при попадании контрастирующего вещества внутрь) либо низкую (при сохранении целостности мембраны) электронную плотность. Основная часть везикул (68%) имела размеры 40-100 нм и морфологические характеристики экзосом (рис. 1г-ж). На электронограммах экзосомы супернатантов СЖ в основном имеют чашеобразную форму, обусловленную сплющиванием пузырька при высушивании препаратов.

Морфологические характеристики везикул, включая их размер, могут быть важной диагностической характеристикой, поэтому в 18 образцах супернатанта СЖ мы измерили случайно выбранные везикулы и микрочастицы (770 структур), из них 552 структуры (72%) представляли собой везикулы размером 40-100 нм (рис. 1в-з), что соответствует размерам экзосом. В свою очередь, 62% этих структур имели размеры 40-60 нм, 26% – 60-80 нм, а везикулы размером 80-100 нм составляли всего 12% (рис. 1и).

Таким образом, супернатанты, полученные при низкоскоростном центрифугировании СЖ здоровых людей, могут быть исследованы методом негативного контрастирования в электронном

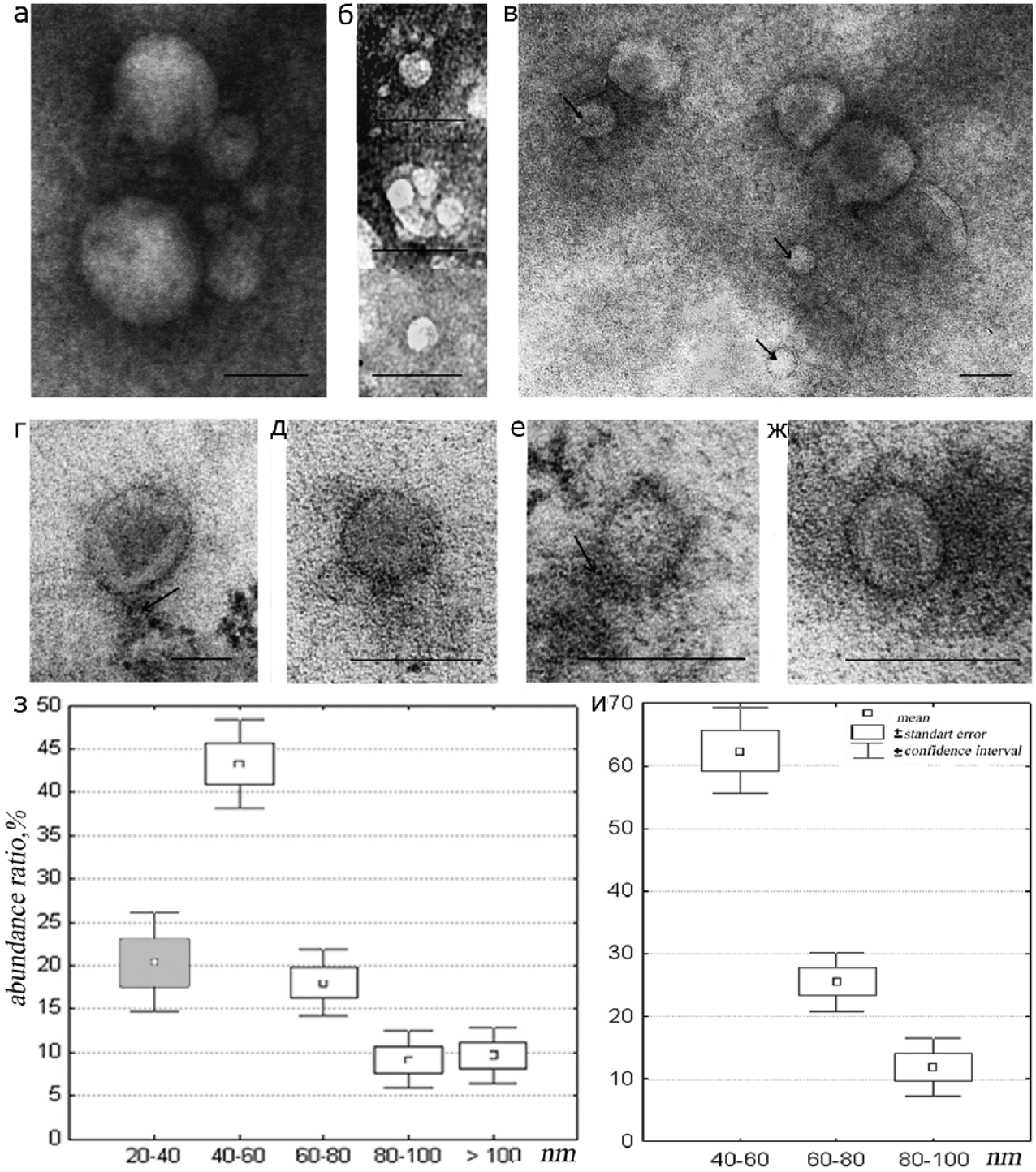

Рисунок 1. Субмикроскопические структуры в супернатантах СЖ: **а** - клеточный детрит; **б** - микрочастицы; **в** - общий вид препарата, стрелками показаны везикулы (40-100 нм); **г** - крупная везикула (>100 нм); **д-ж** - везикулы (40-100 нм). Стрелками показаны участки взаимодействия макромолекулярных агрегатов и везикул. Длина масштабной линии соответствует 200 нм (**а**), 50 нм (**б**), 100 нм (**в-ж**). **з** - распределение размеров всех везикул и микрочастиц в супернатантах СЖ. **и** - распределение размеров везикул 40-100 нм. Серым цветом показана группа микрочастиц 20-40 нм.

микроскопе с целью выявления везикул и микрочастиц и изучения их структуры и размеров. Визуализация везикул в супернатантах СЖ затрудняется наличием макромолекулярных агрегатов, маскирующих везикулы.

Ультраструктура субмикроскопических структур, выделенных из слёзной жидкости

Использованный нами метод получения экзосом широко применяется для выделения и концентрирования внеклеточных везикул и экзосом

из биологических жидкостей [18]. Анализ полученных образцов с помощью ЭМ показал, что ультрафильтрация обеспечивает удаление макромолекулярных агрегатов и структур крупнее 100 нм. Округлые или чашеобразные везикулы размером 40-100 нм (рис. 2а), составляли 83% всех структур образца, и были идентичны по морфологии аналогичным везикулам супернатанта. Форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [18, 19]. Доля микрочастиц в образце составляет 17% (рис. 2е). Таким образом, сочетание ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования обеспечило получение из СЖ препаратов, содержащих более 80% экзосом и сохраняющих соотношение между размерными группами микрочастиц и везикул, наблюдаемое в супернатантах СЖ (рис. 1-2).

Выявление специфических маркеров с помощью меченых антител – общепринятый метод идентификации экзосом [18]. Мы использовали антитела к рецепторам семейства тетраспанинов CD63 и CD9, которые опосредуют адгезию экзосом на поверхности клетки-реципиента, и являются обязательным структурным компонентом мембраны экзосом [18, 20], а также антитела к рецептору CD24 – маркеру активно делящихся и дифференцирующихся клеток, к которым относятся и эпителиальные клетки [21]. Экзосомы, выделенные из СЖ, связывались с антителами к CD3, CD9 и CD24, частицы золота выявлялись на их поверхности (рис. 3б-д). Интересно, что более 80% меченных экзосом имели размер 40-60 нм, а размер оставшихся составлял 60-80 нм. Нужно отметить, что белок CD24 выявлялся на поверхности практически всех экзосом, тогда как белок CD63 присутствовал на поверхности половины экзосом. Эти результаты показывают, что: (1) экзосомы СЖ продуцируются эпителиальными клетками, (2) клетки продуцируют разные типы экзосом, что соответствует наличию различных механизмов сортировки макромолекул в мембране МВТ [22].

Анализ ультратонких срезов осадков, полученных при ультрацентрифугировании, выявил в препаратах клетки, клеточный детрит, волокнистый материал и разнообразные везикулы. Многочисленные везикулы, имеющие размер 40-100 нм, наблюдались в составе скоплений (рис. 3б-в) или взаимодействовали с эпителиальными клетками (рис. 3а). Везикулы были окружены чёткой мембраной, на наружной поверхности которой видны тонкие филаменты, а внутри – отдельные электронно-плотные гранулы (рис. 3). Изучение препаратов, полученных после ультрацентрифугирования подтверждает наличие везикул (40-100 нм) в образцах слёзной жидкости.

Нуклеиновые кислоты в препарате экзосом слёзной жидкости

Экзосомы содержат различные типы рибонуклеиновых кислот, преимущественно микроРНК [3]. С помощью капиллярного электрофореза было показано, что в препарате экзосом СЖ также присутствует РНК размером менее 200 н. (рис. 4а). В этих препаратах нами также была обнаружена геномная двуцепочечная ДНК, в которой, по данным капиллярного электрофореза, преобладала ДНК размером от 3 до 9 т.п.н. (рис. 4б). Распределение концентрации ДНК экзосом СЖ здоровых людей является нормальным (критерий χ^2). Последовательность L1 была обнаружена в 83% случаев в средней концентрации 15±3 нг/мл СЖ, а последовательность α-сателлитного повтора – в 78% образцов в средней концентрации 21±4 нг/мл СЖ (рис. 4в).

Обнаружение ДНК в препаратах экзосом поставило вопрос о локализации её молекул, – внутри везикулы, или на внешней поверхности мембраны. Инкубация препарата экзосом с ДНКазой I привела к разрушению ДНК, что указывает на её локализацию на внешней поверхности мембраны экзосом. Учитывая присутствие микрочастиц в препаратах экзосом, нельзя исключить связь ДНК с этими структурами. Локализация ДНК

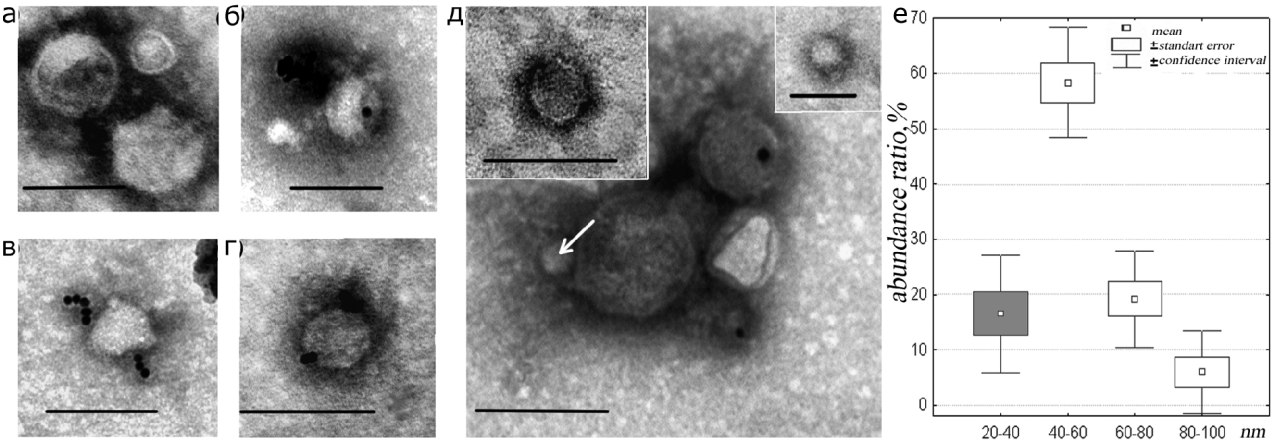

Рисунок 2. Морфологическая характеристика структур, выделенных из СЖ здоровых людей ультрафильтрацией и двойным ультрацентрифугированием. **а** - сферическая и чашеобразная везикулы. Экзосомы меченные антителами к рецептору CD63 (**б**), рецептору CD9 (**в**, **д**), рецептору CD24 (**г**). Отмечены стрелками и на врезках - микрочастицы (**е**). Длина масштабной линии соответствует 100 нм, 50 нм - на врезках. **е** - распределение размеров микрочастиц (20-40 нм, показаны серым) и экзосом, выделенных ультрафильтрацией и двойным ультрацентрифугированием.

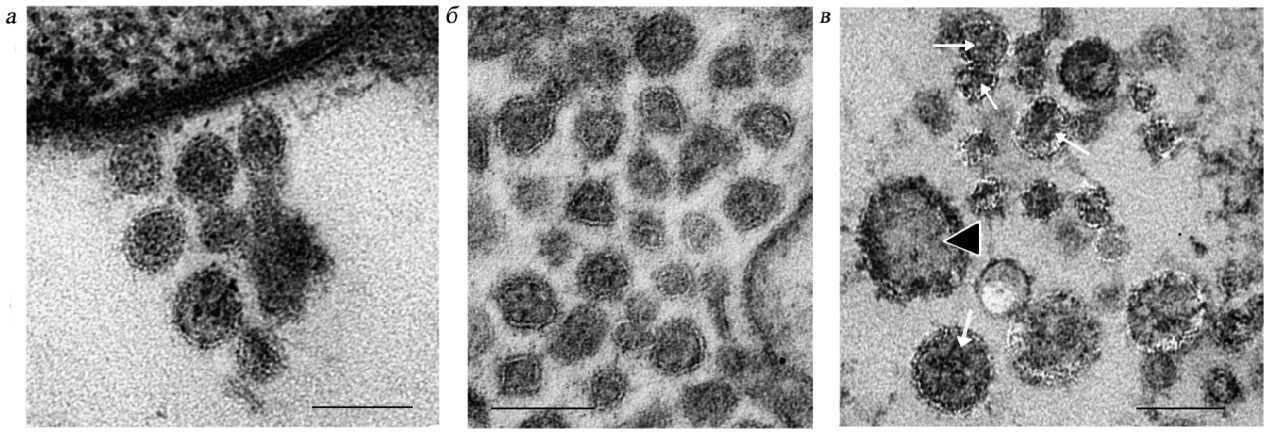

Рисунок 3. Морфологические характеристики субмикроскопических структур СЖ на ультратонких срезах осадков, полученных низкоскоростным центрифугированием (**а**, **б**), и ультрацентрифугированием без ультрафильтрации (**с**). **а** - внеклеточные везикулы контактирующие с плазмолеммой эпителиальной клетки. **б** - скопление внеклеточных везикул. Экзосомы обозначены стрелками, головкой стрелки - крупная везикула. Длина масштабной линии соответствует 100 нм.

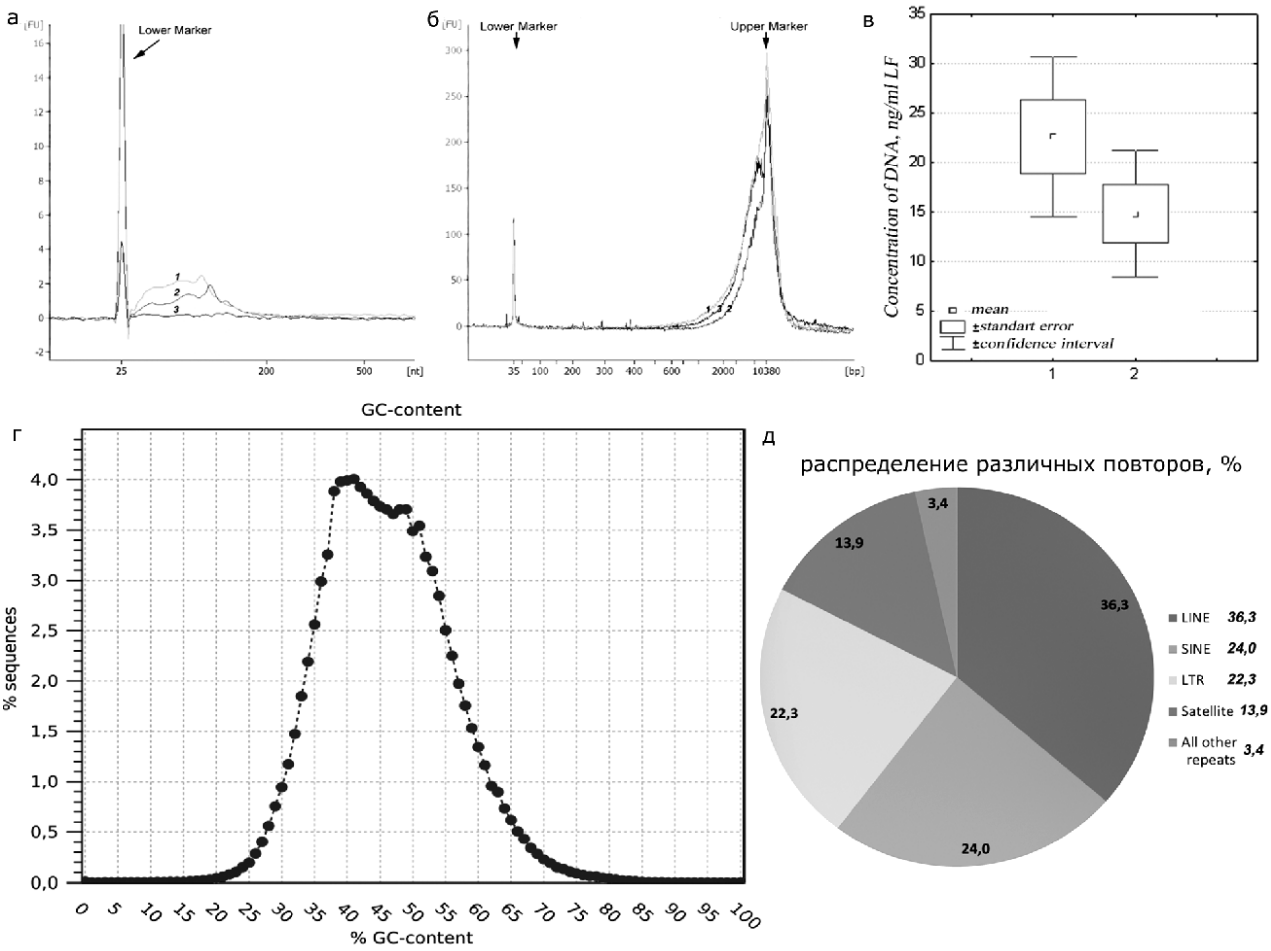

Рисунок 4. Характеристики нуклеиновых кислот в образцах СЖ. **а** - размер РНК, (набор RNA 6000 Pico Kit on Agilent 2100 Bioanalyzer). 1 - интактная РНК образцов, 2 - РНК обработанная ДНКазой I, 3 - РНК обработанная РНКазой А. б - размер ДНК (набор High Sensitivity DNA Kit on Agilent 2100 Bioanalyzer). в - концентрация ДНК, определённая с помощью М-ПЦР-РВ, специфичной к повторам α-satellite (1) и L1 (2). г - распределение содержания ГЦ в картированных прочтениях препаратов ДНК. д - соотношение различных типов повторов в препаратах ДНК.

подтверждается и наличием ДНК в супернатанте после проведения элюции ДНК с поверхности везикул (или микрочастиц). Таким образом, молекулы геномной двуцепочечной ДНК связаны с поверхностью экзосом или микрочастиц, выделенных из СЖ здоровых людей. Учитывая, что в процессе получения препарата эти структуры были дважды подвергнуты ультрацентрифугированию и несколько раз промывались ФБ, можно предположить, что связь молекул ДНК с экзосомами или микрочастицами достаточно прочна.

Секвенирование ДНК препаратов экзосом показало, что примерно 92% всех прочтений картируется на геном человека. Наиболее представлены были прочтения с ГЦ-содержанием 41%, это соответствует среднему значению ГЦ в человеческом геноме, асимметричность пика (рис. 4г) указывает на неравномерную представленность различных частей генома в образце. Около 3% прочтений соответствует экзонам, 54% – генам, 46% приходиться на межгенное пространство. Максимальное покрытие наблюдается для митохондриальных генов и генов *RP11-413E6.7*, *ROCK1P1*, *DUX4L13*, *SDHD_2*, *CDC27*, *AC010970.2*, *DUX4L19*, *CTD-2328D6.1*, *CDC27P1*, *REXO1L1P*, *MDGA2_1*. Доля повторов составляла примерно 31% от всех прочтений, распределение повторов различных типов показано на рисунке 4д. Четыре типа повторов (LINE, SINE, LTR и α-сателлит) составляли 95% от общего количества прочтений. Некартировавшиеся на геном человека последовательности были использованы для сборки *de novo*. Анализ собранных контигов с помощью программы Blast показал, что они соответствуют геномам *Escherichia coli* и *Propionibacterium acnes*.

Присутствие ДНК в экзосомах является предметом дискуссий: опубликовано несколько сообщений о выявлении ДНК в экзосомах [23, 24], однако, большинство авторов считают обнаружение ДНК артефактом, обусловленным контаминацией препаратов мелкими апоптотическими тельцами [25]. Наше исследование показало присутствие двуцепочечной геномной ДНК на внешней поверхности экзосом и/или микрочастиц СЖ здоровых людей. Мы полагаем, что исследования препаратов экзосом людей с офтальмологическими заболеваниями позволят прояснить диагностический потенциал этой ДНК и её биологическое значение.

Исследования последних лет установили участие внеклеточных везикул и экзосом в процессах воспаления, иммунного ответа, канцерогенеза и метастазирования, патогенеза метаболических заболеваний [1, 2]. Эти структуры в настоящее время рассматриваются в качестве универсальной информационной системы организма, обеспечивающей передачу молекулярных сигналов (белки, различные РНК, гликопротеины, липиды) между его органными и клеточными системами. Экзосомы не только обеспечивают адресную доставку молекулярных сигналов клеткам-реципиентам, но и несут уникальные маркеры клетки-продуцента, что делает их многообещающим субстратом в диагностических исследованиях, в первую очередь, с использованием их малых РНК и белков [3, 26]. Недавние исследования экзосом водянистой влаги глаза выявили около 10 различных микроРНК, связанных с патогенезом глаукомы [27]. Эти результаты позволяют предполагать, что детальное исследование экзосом СЖ будет полезным для понимания патогенеза офтальмологических заболеваний, в частности, связанных с передней поверхностью глаза. Слёзная жидкость является перспективным объектом для исследований экзосом и микрочастиц. Во-первых, СЖ содержит экзосомы в высокой концентрации, во-вторых, нет другого субстрата органа зрения, доступного для анализа без нарушения целостности глазного яблока и, наконец, состав СЖ позволяет сравнивать её структуры в нативном состоянии с полученными после концентрирования и очистки, что невозможно сделать с другими жидкостями тела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование показало, что СЖ является сложной системой, содержащей субмикроскопические структуры, включая экзосомы. Природа экзосом была подтверждена с помощью моноклональных антител к специфическим для экзосом рецепторам CD63, CD9 и CD24. Экзосомы, полученные из СЖ, содержат РНК и двуцепочечную геномную ДНК, для понимания роли которых в развитии патологических процессов в органе зрения необходимы дальнейшие исследования. На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Слёзная жидкость людей может быть исследована методами электронной микроскопии и использована для выделения внеклеточных везикул, экзосом и микрочастиц.

2. Слёзная жидкость содержит экзосомы, доля которых составляет 80% в препаратах, полученных сочетанием ультрафильтрации и двойного ульрацентрифугирования.

3. Препараты экзосом содержат фрагменты геномной двуцепочечной ДНК, которая локализуется на наружной поверхности экзосом (и/или микрочастиц).

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН №5 "Фундаментальные науки – медицине" (проект № 35), Новосибирского филиала МНТК "Микрохирургия глаза им. ак. С.Н. Федорова", Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 84, а также БОР №VI.62.1.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Verma M., Lam T.K., Hebert E., Divi R.L.* (2015) BMC Clin. Pathol., **15**, 6.
2. *De Toro J., Herschlik L., Waldner C., Mongini C.* (2015) Front. Immunol., **6**, 203.
3. *Lasser C.* (2015) Exp. Opin. Biol. Ther., **15**(1), 103-117.

4. *Yang C., Robbins P.D.* (2011) Clin. Dev. Immunol., **2011,** 842-849.
5. *Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borras F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J. et al.* (2015) J. Extracell. Vesicles, **4,** 27066.
6. *Perkumas K.M., Hoffman E.A., McKay B.S., Allingham R.R., Stamer W.D.* (2007) Exp. Eye Res., **84**(1), 209-212.
7. *Stamer W.D., Hoffman E.A., Luther J.M., Hachey D.L., Schey K.L.* (2011) J. Proteomics, **74**(6), 796-804.
8. *Biasutto L., Chiechi A., Couch R., Liotta L.A., Espina V.* (2013) Exp. Cell Res., **319**, 2113-2123.
9. *Santacruz C., Linares M., Garfias Y., Loustaunau L.M., Pavon L., Perez-Tapia S.M., Jimenez-Martinez M.C.* (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 4850-4864.
10. *Stolwijk T.R., Kuizenga A., van Haeringen N.J., Kijlstra A., Oosterhuis J.A., van Best J.A*. (1994) Acta Ophthalmol. (Copenh), **72**(3), 357-362.
11. *Григорьева А.Е., Еремина А.В., Дружинин И.Б., Черных Д.В., Варваринский Е.В., Рябчикова Е.И.* (2013) Офтальмохирургия, **4,** 104-107.
12. *Cheruvanky A., Zhou H., Pisitkun T., Kopp J.B., Knepper M.A., Yuen P.S., Star R.A.* (2007) Am. J. Physiol. Renal. Physiol., **292**, F1657-1661.
13. *Gould S.J., Raposo G.* (2013) J. Extracell. Vesicles, **2**, 20389.
14. *Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzas E.I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y.S., Kurochkin I.V., Mathivanan S., Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M.H., Witwer K.W., Thery C.* (2014) J. Extracell. Vesicles, **3**, 26913.
15. *Sack R.A., Conradi L., Krumholz D., Beaton A., Sathe S., Morris C.* (2005) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **46**, 1228-1238.
16. *Bryzgunova O., Bondar A., Morozkin E., Mileyko E., Vlassov V., Laktionov P.* (2011) Analytical Biochemistry, **408,** 354-356.
17. *Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P.* (2008) Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum V, **1137**, 214-217.
18. *Lasser C., Alikhani V.S., Ekstrom K., Eldh M., Paredes P.T., Bossios A., Sjostrand M., Gabrielsson S., Lotvall J., Valadi H.* (2011) J. Transl. Med., **9**, 9.
19. *Pitto M., Corbetta S., Raimondo F.* (2015) Methods Mol. Biol., **1243**, 43-53.
20. *Pols M.S., Klumperman J.* (2009) Exp. Cell. Res., **315**, 1584-1592.
21. *King J.B., von Furstenberg R.J., Smith B.J., McNaughton K.K., Galanko J.A., Henning S.J.* (2012) Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., **303**(4), G443-452.
22. *Villarroya-Beltri C., Baixauli F., Gutierrez-Vazquez C., Sanchez-Madrid F., Mittelbrunn M.* (2014) Semin. Cancer Biol., **28**, 3-13.
23. *Thakur B.K., Zhang H., Becker A., Matei I., Huang Y., Costa-Silva B., Zheng Y., Hoshino A., Brazier H., Xiang J. et al.* (2014) Cell Res., **24**, 766-769.
24. *Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R.* (2014) J. Biol. Chem., **289**, 3869-3875.
25. *van der Pol E., Hoekstra A.G., Sturk A., Otto C., van Leeuwen T.G, Nieuwland R.* (2010) J. Thromb. Haemost., **8**, 2596-2607.
26. *Sato-Kuwabara Y., Melo S.A., Soares F.A., Calin G.A.* (2015) Int. J. Oncol., **46**(1), 17-27.
27. *Dismuke W.M., Challa P., Navarro I., Stamer W.D., Liu Y.* (2015) Exp. Eye Res., **132**, 73-77.

Поступила: 07. 10. 2015.
Принята к печати: 16. 12. 2015.

CHARACTERISTICS OF EXOSOMES AND MICROPARTICLES DISCOVERED IN HUMAN TEARS

A.E. Grigor'eva[1], S.N. Tamkovich[1,3], A.V. Eremina[2], A.E. Tupikin[1], M.R. Kabilov[1], V.V. Chernykh[2], V.V. Vlassov[1], P.P. Laktionov[1], E.I. Ryabchikova[1]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS,
8 Lavrent'ev av., Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail: lenryab@yandex.ru
[2]Novosibirsk Branch of FSBI "The Acad. S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex", Novosibirsk, Russia
[3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Exosomes represent a sort of extracellular vesicles, which transfer molecular signals in organism and possess markers of producing cells. Our study was aimed at search of exosomes in the tears of healthy humans, confirmation of their nature and examination of exosome morphological and molecular-biological characteristics. The tears (110-340 μl) were collected from 24 healthy donors (aged 46-60 years); individual probes were centrifuged at 20000 g for 15 min to pellet cell debris. The supernatants were examined in electron microscope using negative staining; and they were also used for isolation and purification of the exosomes by filtration (100 nm pore-size) and double ultracentrifugation (90 min at 100000 g, 4°C). The "pellets" were subjected to electron microscopy, immunolabeling. The RNA and DNA were isolated from the samples, and their sizes were evaluated by capillary electrophoresis, the concentration and localization of nucleic acids were determined. Sequencing of DNA was performed using MiSeq ("Illumina", USA), data were analyzed using CLC GW 7.5 ("Qiagen", USA). Sequences were mapped on human genome (hg19). Electron microscopy revealed in supernatants of the tears cell debris, spherical microparticles (20-40 nm), membrane vesicles and macromolecular aggregates. The "pellets" obtained after ultracentrifugation, contained microparticles (17%), spherical and cup-shaped EVs (40-100 nm, 83%), which were positive for CD63, CD9 and CD24 receptors (specific markers of exosomes). Our study showed presence of high amount of exosomes in human tears, and relation of the exosomes with RNA (size less than 200 nt) and DNA (size was 3-9 kb). Sequencing of the DNA showed that about 92% of the reads mapped to human genome.

Key words: tears, electron microscopy, extracellular vesicles, exosomes, DNA