

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Григорьева Алина Евгеньевна

Слезная жидкость как субстрат для оценки состояния структур глаза

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
профессор, д.б.н. Рябчикова Е.И.

**Новосибирск - 2016**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1 Заболевания, поражающие орган зрения.....	14
1.2 Состав и физические свойства слезной жидкости.....	17
1.3 Диагностический потенциал слезной жидкости .....	19
1.4 История изучения экзосом .....	22
1.5 Механизмы формирования экзосом .....	27
1.6 Взаимодействие экзосом с клетками-реципиентами.....	34
1.7 Экзосомы – транспортёры биологически активных молекул. Перспективы использования экзосом в клинической практике.....	37
1.8 Исследования экзосом в офтальмологии .....	43
1.9 Заключение.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	47
2.1 Реагенты .....	47
2.2 Сбор слезной жидкости .....	47
2.3 Выделение экзосом из слезной жидкости.....	49
2.4 Иммуноцитохимическое выявление экзосом .....	49
2.5 Выделение экзосом из биологических жидкостей.....	50
2.6 Изучение образцов методом негативного контрастирования .....	55
2.7 Изучение слезной жидкости методом ультратонких срезов .....	56
2.8 Терминология, использованная в данной работе для описания субмикроскопических структур.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1 Визуализация компонентов образцов частиц, выделенных из биологических жидкостей .....	60
3.1.1 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из кондиционированной культуральной среды .....	63
3.1.2 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из крови здоровых	

людей и больных раком молочной железы.....	67
3.1.3 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы .....	72
3.1.4 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из молока кобыл.....	76
3.2 Характеризация компонентов слезной жидкости .....	84
3.2.1 Ультраструктура осадков слезной жидкости .....	88
3.2.2 Ультраструктура супернатантов слезной жидкости.....	98
3.2.3 Ультраструктурная характеристика образцов частиц, выделенных из слезной жидкости .....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	115
ВЫВОДЫ.....	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122

## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

СЖ – слезная жидкость

ДР – диабетическая ретинопатия

ПДР – пролиферативная диабетическая ретинопатия

НПДР – непролиферативная диабетическая ретинопатия

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

ПОУГ I – начальная стадия первичной открытоугольной глаукомы

ПОУГ II – развитая стадия первичной открытоугольной глаукомы

ПОУГ III – далеко зашедшая стадия первичной открытоугольной глаукомы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

DMEM - среда Eagle в модификации Dulbecco (Dulbecco modified Eagle medium)

IMDM - среда Dulbecco в модификации Iscove (Iscove modified Dulbecco medium)

ФВК – фосфорновольфрамовая кислота

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Нарастающая нагрузка на глаза неуклонно приводит к снижению остроты зрения и возрастанию частоты офтальмологических заболеваний у населения развитых стран. Несмотря на значительный прогресс в методах лечения офтальмологических заболеваний, в офтальмологии существует много нерешенных проблем, связанных с патогенезом и ранней диагностикой заболеваний глаз. В офтальмологической практике применяют различные методы, основанные на визуализации структур глаза, однако, они не позволяют получить представление о состоянии глубоких тканей, которые становятся доступны для комплексного анализа лишь при нарушении целостности органа зрения. В связи с этим, актуальным является поиск новых способов оценки состояния структур глаза, поэтому внимание исследователей привлекает легко и атравматично доступная слезная жидкость (СЖ).

Биохимические и иммунологические исследования СЖ высоко информативны и внедряются в клиническую практику (Stolwijk et al. 1994; Черных и др. 2006; Якушев и др. 2011), тогда как электронно-микроскопический анализ компонентов СЖ, которые могут отражать состояние тканевых структур органа зрения, не проводился. Между тем, СЖ априори содержит слущенные клетки эпителия конъюнктивы и роговицы, их фрагменты, различные макромолекулярные структуры, и, возможно, их морфологические параметры могут изменяться при офтальмологических заболеваниях. Проверке этого предположения и посвящена данная работа.

Исследование СЖ здоровых людей с помощью просвечивающей электронной микроскопии необходимо, чтобы идентифицировать клеточные и субклеточные компоненты СЖ и описать их ультраструктуру. Офтальмологические заболевания могут приводить к разным изменениям морфологии компонентов СЖ и, чтобы установить это, была исследована СЖ больных тяжелыми офтальмологическими заболеваниями - диабетической

ретинопатией (ДР) и первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ). Диабетическая ретинопатия представляет собой микроангиопатию и, хотя основной зоной патологических изменений является сетчатка, в патологический процесс вовлекаются все структуры органа зрения. Первичная открытоугольная глаукома - нейропатия, патологические изменения затрагивают только глубокие структуры глаза, соответственно, СЖ, связанная только с передним отделом органа зрения, может не отражать процессы, протекающие при развитии ПОУГ.

Потенциально в СЖ могут присутствовать внеклеточные везикулы, согласно современным представлениям, выделяемые всеми клетками организма, и, предположительно, играющие важную роль в физиологических и патологических процессах (Fuhrmann et al. 2015; Lasser 2015; Sato-Kuwabara et al. 2015). Соответственно, выявление и комплексное исследование внеклеточных везикул СЖ является актуальной задачей, так как они могут стать не только источником диагностической информации, но и помочь пониманию механизмов патогенеза офтальмологических заболеваний.

Исследование ультраструктуры компонентов СЖ, в том числе и внеклеточных везикул, а также оценка изменений, которые они претерпевают при офтальмологических заболеваниях, является актуальной задачей. Решение которой позволит использовать СЖ в качестве субстрата для оценки состояния структур глаза с помощью электронно-микроскопического исследования и молекулярно-биологических методов.

**Цели и задачи исследования.** Цель данной работы: изучить субмикроскопический состав слезной жидкости здоровых людей и определить её компоненты, изменяющиеся при диабетической ретинопатии (ДР) и первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ).

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать в сравнительном аспекте клеточный и субклеточный состав слезной жидкости здоровых людей и больных ДР и ПОУГ методом ультратонких срезов.
2. Исследовать в сравнительном аспекте состав макромолекулярных компонентов и субмикроскопических частиц слезной жидкости здоровых людей и больных ДР и ПОУГ методом негативного контрастирования.
3. Идентифицировать по морфологическим параметрам компоненты образцов субмикроскопических частиц, полученных методом последовательных центрифугирований из различных биологических жидкостей (кровь, моча, молоко, культуральная жидкость, слезная жидкость), и оценить соотношение везикул и примесей.
4. Определить экзосомы с помощью меченных антител к основным их маркерам, тетраспанинам CD63 и CD9, в образцах субмикроскопических частиц, выделенных из разных биологических жидкостей.

**Научная новизна.** Впервые проведено ультраструктурное исследование рефлекторной СЖ здоровых людей и больных ДР и ПОУГ. В образцах СЖ здоровых людей выявлены эпителиоциты и лейкоциты, субклеточные структуры (компоненты слезной пленки, клеточный детрит и внеклеточные везикулы, часть из которых по морфологическим признакам может быть отнесена к экзосомам), а также макромолекулярные агрегаты. Впервые выявлены различия состава СЖ здоровых людей и СЖ больных ДР и ПОУГ, которые могут служить диагностическими признаками при выявлении данных заболеваний. Показана эффективность метода очистки и концентрирования экзосом СЖ, включающего ультрафильтрацию и двойное ультрацентрифугирование. Впервые показано присутствие в СЖ внеклеточных везикул и микрочастиц, иммуноцитохимическим методом установлено присутствие экзосом. Установлена эффективность метода последовательных центрифугирований: доля везикул, имеющих морфологические признаки экзосом, в образцах, полученных из СЖ, крови,

мочи, молока и культуральной жидкости составляет 60 - 80 %. Впервые показано присутствие во всех этих образцах микрочастиц, способных исказить результаты молекулярно-биологических исследований экзосом.

**Научно-практическая значимость.** В ходе работы получены данные о клеточном и субклеточном составе СЖ и его изменениях при развитии ДР и ПОУГ, которые могут быть использованы в клинической практике для диагностики данных заболеваний и для изучения их патогенеза. Предложен метод выделения экзосом из слезной жидкости, оценена доля экзосом в полученных образцах и подтверждена природа выделенных везикул с помощью иммуноэлектронной микроскопии. Данные исследования являются необходимой базой для изучения экзосом СЖ с помощью молекулярно-биологических методов с целью поиска молекулярных маркеров офтальмологических заболеваний. Установлено, что образцы, выделенные с помощью общепринятых методов из крови, мочи, молока и культуральной жидкости содержат не только экзосомы, но и компактные агрегаты белков, не имеющие мембраны (микрочастицы), которые могут влиять на результаты молекулярно-биологических исследований. Эти данные определяют необходимость электронно-микроскопического анализа образцов, предназначенных для исследования экзосом, для адекватной оценки и интерпретации результатов молекулярно-биологических исследований экзосом.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Слезная жидкость здоровых людей содержит следующие компоненты: клетки (эпителиоциты и лейкоциты), субклеточные компоненты (липиды и муцины слезной пленки, белки в виде макромолекулярных агрегатов), клеточный детрит и внеклеточные везикулы – экзосомы и «мохнатые» везикулы.

2. Развитие диабетической ретинопатии и первичной открытоугольной глаукомы влияет на состав и ультраструктуру компонентов слезной жидкости.
3. Все препараты, выделяемые методом последовательных центрифугирований из разных биологических жидкостей (крови, мочи, молока, слезной жидкости и культуральной жидкости), помимо везикул содержат компоненты, не имеющие ограничивающей мембраны, - микрочастицы и компактные частицы детрита.
4. Слезная жидкость содержит экзосомы, которые, по морфологическим параметрам и присутствию основных маркеров (тетраспанинов), не отличаются от экзосом, содержащихся в других биологических жидкостях.

**Публикации.** По теме диссертации было опубликовано 10 работ, из них 5 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

**Статьи:**

1. **Григорьева А.Е.**, Еремина А.В., Дружинин И.Б., Черных Д.В., Варваринский Е.В., Рябчикова Е.И. Диагностический потенциал электронно-микроскопического анализа слезной жидкости людей // Офтальмохирургия. – 2013. – Т. 4 – С. 104-107.
2. **Григорьева А.Е.**, Еремина А.В., Тамкович С.Н., Черных В.В., Власов В.В., Рябчикова Е.И. Ультраструктурный анализ слезной жидкости у пациентов с диабетической ретинопатией // Бюллетень СОРАМН. – 2014. – Т. 34. – № 3. – С. 31-36
3. Еремина А.В., **Григорьева А.Е.**, Дружинин И.Б., Черных Д.В., Варваринский Е.В., Рябчикова Е.И. Возможность использования электронно-микроскопического анализа для исследования слезной жидкости и стекловидного тела людей // Вестник ТГУ. - 2014.– Т. 19. - № 4. – С. 1114-1119

4. **Григорьева А.Е.**, Тамкович С.Н., Еремина А.В., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Черных В.В., Власов В.В., Лактионов П.П., Рябчикова Е.И. Экзосомы слезной жидкости здоровых людей: выделение, идентификация и характеристика // Биомедицинская химия. - 2016. - Т.62. - №1. - С. 99-106
- Данная статья опубликована на английском языке: Grigor'eva A. E., Tamkovich S. N., Eremina A. V., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Chernykh V. V., Vlassov V. V., Laktionov P. P., Ryabchikova E. I. Exosomes in tears of healthy individuals: isolation, identification, and characterization // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2016. – Vol. 10. – I. 2. – P. 165-172
5. Bryzgunova O.E., Zaripov M.M., Skvortsova T.E., Lekchnov E.A., **Grigor'eva A.E.**, Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Ryabchikova E.I., Yurchenko U.B., Voitsitskiy V.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Microvesicles in healthy and prostate cancer patients urine: size distribution, composition and diagnostic potential // Plos One. – 2016. – I. 11. – Vol.6. – P. e0157566

#### Патент:

1. Патент №2556825 Российская Федерация МПК С 12 N 5/00 Способ получения экзосом из крови / Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Рябчикова Е.И., **Григорьева А.Е.**, Власов В.В.; Патентообладатель: Институт химической биологии и фундаментальной медицины. - 2014137279/10; заявление 15.09.2014; опубликовано 20.07.2015, Бюл. № 20.

#### Тезисы:

1. **Григорьева А.Е.**, Еремина А.В., Черных Д.В., Варваринский Е.В., Черных В.В., Рябчикова Е.И. Ультраструктурная характеристика слезной жидкости больных диабетической ретинопатией // Конференция «Фундаментальные науки – медицине», посвященная 10-

летию Медицинского факультета НГУ, 16-20 сентября 2013, Новосибирск, Россия, С. 126

2. **Григорьева А.Е.**, Тамкович С.Н., Еремина А.В. Исследование микрочастиц слезной жидкости здоровых людей и пациентов с открытоугольной глаукомой и диабетической ретинопатией // I Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, 7-8 октября, 2014, Научград Кольцово, Россия, ISBN 978-5-4437-0297-1 С. 111-114.
3. **Григорьева А.Е.**, Тамкович С.Н., Кабилов М.Р., Еремина А.В.. Свойства внеклеточных везикул слезной жидкости здоровых людей и больных первичной открытоугольной глаукомой // II Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, 1 октября, 2015, Научград Кольцово, Россия, ISBN 978-5-4437-0438-8 С. 163-166
4. **Григорьева А.Е.**, Тамкович С.Н., Еремина А.Е.. Структурные компоненты слезной жидкости здоровых людей и больных первичной открытоугольной глаукомой // VIII Всеросс. С международным участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-2015», 5-9 октября, 2015, Новосибирск, Россия, ISBN 978-5-4437-0443-2 С. 123

**Апробация результатов.** Материалы диссертации были представлены на научной конференции «Фундаментальные науки – медицине», посвященной 10-летию факультета медицинский наук НГУ (Новосибирск, сентябрь 2013), на научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной офтальмологии» (Новосибирск, ноябрь 2013), на всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные исследования в офтальмологии» (Новосибирск, июнь 2014), на I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, октябрь 2014), на II Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и

вирусологов (Новосибирск, октябрь 2015) и всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-2015» (Новосибирск, октябрь 2015).

**Личный вклад автора.** Работы по электронно-микроскопическому исследованию всех описанных образцов выполнены автором самостоятельно. Автором, под руководством к.б.н. Тамкович С.Н. (лаб. молекулярной медицины, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) были выделены частицы из слезной жидкости людей больных первичной открытоугольной глаукомой и диабетической ретинопатией. Выделение частиц из слезной жидкости здоровых людей были выполнены к.б.н. Тамкович С.Н. Образцы слезной жидкости были собраны врачом-офтальмологом Ереминой А.В. (Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза», Новосибирск). Лично автором выполнено выделение частиц из культуральной жидкости клеток линии MDCK, культивирование данных клеток проведено к.б.н. Челобановым Б.П. (лаб. химии нуклеиновых кислот, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СОРАН). Образцы частиц культуральной жидкости клеток линии MCF-7, крови здоровых людей и больных раком молочной железы были выделены и предоставлены для электронно-микроскопического исследования к.б.н. Тамкович С.Н. Образцы частиц мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы были получены и предоставлены для исследования к.б.н. Брызгуновой О.Е. (лаб. молекулярной медицины, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СОРАН). Работы по выделению частиц из молока проводились к.б.н. Седых С.Е. (лаб. ферментов репарации, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СОРАН).

**Благодарности.** Автор глубоко признателен всем сотрудникам группы микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН за помощь в выполнении

данной работы. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю профессору Рябчиковой Е.И. за безграничное терпение и постоянную поддержку, обучение и огромную помощь в подготовке диссертационной работы.

Автор благодарит врача-офтальмолога Еремину А.В. за помощь в сборе материала и проведении экспериментов со слезной жидкостью. Автор глубоко признателен к.б.н. Тамкович С.Н. за помощь в планировании, подготовке и проведении экспериментов с экзосомами. Автор благодарит к.б.н. Тамкович С.Н., к.б.н. Брызгунову О.Е., к.б.н. Челобанова Б.П. и к.б.н. Седых С.Е. за предоставление образцов экзосом для исследования.

Автор выражает огромную благодарность всем сотрудникам Института химической биологии и фундаментальной медицины – добровольным донорам слезной жидкости.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Заболевания, поражающие орган зрения

Орган зрения, один из пяти сенсорных органов человека, состоит из глазного яблока, зрительного нерва и вспомогательных элементов (слезного аппарата, век и мышц). Глазное яблоко включает в себя прозрачное внутреннее ядро (стекловидное тело), хрусталик, водянистую влагу, и три оболочки: наружную (склеру и роговицу), сосудистую и сетчатую (рис. 1.1 А). Орган зрения – основной источник информации для человека, стремительно возрастающая нагрузка в условиях современного мира приводит к появлению новых офтальмологических заболеваний и возрастанию частоты известных. Без сомнения, снижение остроты зрения или его потеря негативно влияют на качество жизни и работоспособность людей.

На сегодняшний день в международной классификации болезней (МКБ-10) выделяют 60 групп болезней глаза и его придаточного аппарата. Ведется активная разработка подходов к диагностике и лечению, в том числе хирургическому, всех заболеваний, как связанных с поверхностными структурами органа зрения, так и с глубокими. Увеличение частоты встречаемости некоторых офтальмологических заболеваний является важной медико-социальной проблемой. Например, в настоящее время симптомы синдрома сухого глаза (ССГ) отмечаются у каждого второго активного пользователя персонального компьютера. «Синдром сухого глаза» определяется как комплекс признаков поражения эпителия роговицы и конъюнктивы вследствие снижения качества и/или количества слезной жидкости (СЖ) (Сомов и др. 1994), и относится к заболеваниям, затрагивающим поверхностные структуры глаза. ССГ диагностируют с помощью оценки суммарной (основной и рефлекторной) слезопродукции и

биомикроскопии эпителия роговицы каждого глаза пациента. Синдром «сухого глаза» часто сопровождается другими офтальмологическими заболеваниями, в том числе глаукому (Бржеский и др. 2014), которая занимает одно из первых мест среди причин неизлечимой слепоты у людей старшего возраста и затрагивает глубокие структуры органа зрения. В соответствии с определением, приведенным в «Национальном руководстве по глаукоме», термин «глаукома» объединяет большую группу заболеваний, каждое из которых имеет свои особенности. Объединение этих заболеваний в одну группу обусловлено общим для всех комплексом симптомов: нарушение гидродинамики глаза, повышение уровня офтальмотонуса, нейропатия и ухудшение зрительных функций. При первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ) патологические изменения не затрагивают угол передней камеры глаза, внутриглазное давление повышается вследствие затруднения оттока водянистой влаги через венозный синус склеры (Шлеммов канал) (Rohen et al. 1981), в связи с этим активно исследуются изменения строения данных тканей при развитии ПОУГ с помощью различных методов визуализации (McMenamin et al. 1980; Gong et al. 2002; Johnson et al. 2016). Повышение внутриглазного давления приводит к гибели нейронов сетчатки (Doucette et al. 2015). Выделяют 4 стадии развития ПОУГ: начальную (ПОУГ I), развитую (ПОУГ II), далеко зашедшую (ПОУГ III) и терминальную (ПОУГ IV). Диагностируют глаукому с помощью теста полей зрения. Стадии глаукомы определяются состоянием поля зрения и диска зрительного нерва. При ПОУГ I границы поля зрения нормальные, но есть небольшие изменения в парацентральных отделах поля зрения. ПОУГ II характеризуется выраженными изменениями поля зрения в парацентральном отделе в сочетании с его сужением. ПОУГ III - границы поля зрения концентрически сужены или имеется выраженное сужение в одном из сегментов. При ПОУГ IV происходит полная потеря зрения, иногда сохраняется цветоощущение с неправильной проекцией или небольшой островок поля зрения в височном секторе. Глаукома является неизлечимым заболеванием, для замедления

потери зрения применяют препараты, снижающие внутриглазное давление, проводят трабекулоэктомию, которая облегчает отток водянистой влаги через Шлеммов канал. Ранняя диагностика и своевременное применение лекарственных препаратов позволяют больным ПОУГ сохранять зрение в течение длительного времени.

Другим распространенным хроническим заболеванием, при котором патологические процессы протекают в глубоких тканях глаза, является диабетическая ретинопатия (ДР). Диабетическая ретинопатия — поражение сосудов сетчатой оболочки глазного яблока, является частым осложнением сахарного диабета, которое может привести к слепоте. Главные факторы риска — повышенная концентрация глюкозы в крови и артериальная гипертензия. На начальной стадии болезни (непролиферативная ДР) повышается проницаемость стенок сосудов сетчатки, происходят кровоизлияния. Из-за повреждения сосудов нейроны сетчатки не получают достаточное количество питательных веществ. Проллиферативная стадия ДР характеризуется разрастанием новых кровеносных сосудов, которые заменяют поврежденные. Стенка новообразованных сосудов очень хрупкая, поэтому частота кровоизлияний возрастает. Сгустки крови препятствуют прохождению света через стекловидное тело к сетчатке, что приводит к постепенной потере зрения. Диабетическую ретинопатию диагностируют при осмотре сосудов сетчатки с помощью офтальмоскопии. Риск развития пролиферативной ДР, приводящей к необратимой слепоте, значительно возрастает с возрастом, поэтому необходима разработка новых подходов к ранней диагностике и профилактике данного заболевания (Li et al. 2013). Для лечения ДР применяют препараты, препятствующие ангиогенезу (Hwang et al. 2016), которые снижают частоту кровоизлияний и значительно замедляют потерю зрения.

Отдельной проблемой современной офтальмологии является разработка способов быстрой проверки состояния передней поверхности глаза при аппликации лекарственных препаратов. Например, длительный прием

противоглаукомных препаратов часто сопровождается повреждением эпителия роговицы и конъюнктивы (Noecker et al. 2004; Pozarowska et al. 2010), это определяет необходимость разработки новых препаратов, не имеющих побочного действия.

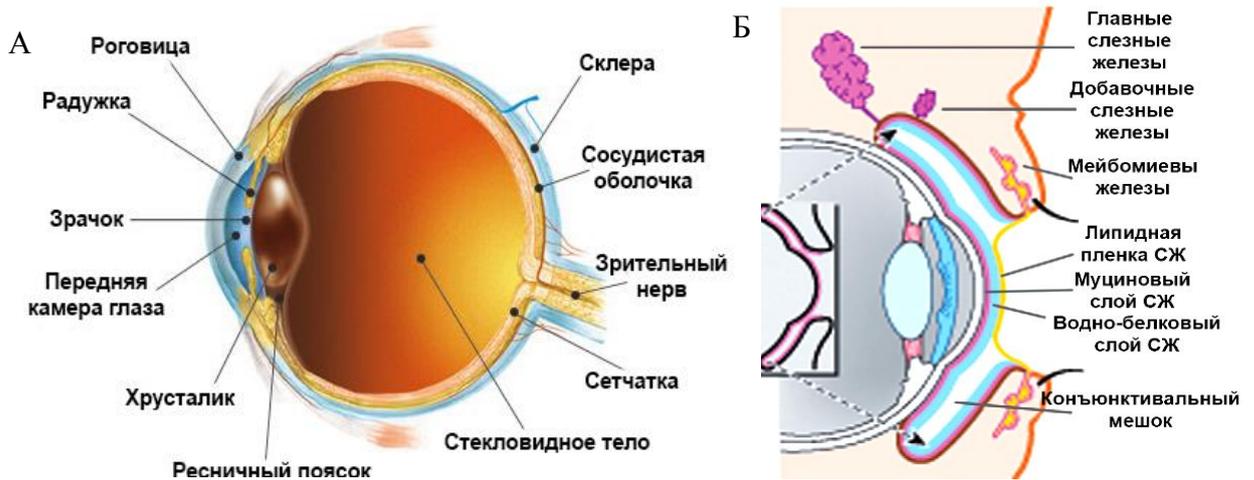
Несмотря на прогресс в методах лечения офтальмологических заболеваний, в офтальмологии существует много проблем, в частности, проблема ранней диагностики, так как некоторые заболевания на ранних стадиях протекают бессимптомно, а на поздних плохо поддаются лечению. Многие заболевания, необратимо приводящие к слепоте, затрагивают глубокие структуры органа зрения, недоступные для исследования без нарушения его целостности, что делает актуальным поиск атравматичных способов оценки состояния всех структур органа зрения, в том числе и глубоких. Такие способы могут базироваться на исследованиях СЖ.

## **1.2 Состав и физические свойства слезной жидкости**

Слезная жидкость - многокомпонентный секрет, находящийся в конъюнктивальной полости и постоянно увлажняющий наружную поверхность эпителия роговицы и конъюнктивы. Слезная жидкость (СЖ) обеспечивает нормальное функционирование органа зрения, служит смазкой внутренней поверхности век, конъюнктивы и роговицы для предотвращения механического повреждения; обеспечивает питание клеток роговицы, не имеющих доступа к кровеносным сосудам, транспорт кислорода и глюкозы; доступ лейкоцитов к поверхности роговицы (Ohashi et al. 2006); защищает поверхности роговицы и конъюнктивы от высыхания и проникновения инородных тел (Lemp et al. 1981) и микроорганизмов (Flanagan et al. 2009). Реализация функций СЖ обеспечивается не только её химическим составом, но и организацией в трехслойную слезную пленку на передней поверхности глаза (рис. 1.1 Б).

У здорового человека выделяющаяся при слезоотделении СЖ прозрачная или слегка опалесцирующая, со слабощелочной реакцией (Сомов и др. 1994),

содержит электролиты, белки и гликопротеины, углеводы и продукты их метаболизма, различные липиды. На сегодняшний день в СЖ определено около 1500 различных белков, основную долю которых (90 %) составляют лактоферрин, липокалин, иммуноглобулин А (IgA), лизоцим, лакритин и белки, богатые пролином (Zhou et al. 2012). Лизоцим гидролизует протеогликаны клеточной стенки грамположительных микроорганизмов, а при взаимодействии с грамотрицательными микроорганизмами его катионные группы связываются с отрицательно заряженной поверхностью бактерий, что приводит к их гибели (Nash, Ballard et al. 2006). Лактоферрин обладает широким спектром повреждающего действия против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, грибов, вирусов и гельминтов (Garcia-Montoya et al. 2012). Иммуноглобулин А (IgA) взаимодействует с поверхностью микроорганизмов и препятствует их адгезии на поверхности роговицы (Johansen et al. 2011). Слезная жидкость содержит около 150 видов липидов, которые относятся к шести классам: фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, триглицериды, церамиды, сфингомиелины и фосфатидилсерины (Rantamaki et al. 2011). Липиды обеспечивают стабильность слезной пленки, отвечают за её равномерное распределение по поверхности роговицы и предотвращают испарение её водного слоя. Муцины СЖ - большой класс гликопротеинов, образующих разветвленную сеть на передней поверхности глаза, и хорошо известных своими защитными свойствами: они связывают микроорганизмы и другие инородные тела и препятствуют их адгезии на поверхности роговицы (Mantelli et al. 2008). Сложность состава СЖ предполагает возможность его зависимости от функционального состояния глаза, однако, исследования изменений ультраструктуры компонентов СЖ при развитии офтальмологических заболеваний не опубликованы.



**Рисунок 1.1.** А - Строение глазного яблока. Б – Строение слезного аппарата и слезной пленки (Сher, 2012).

### 1.3 Диагностический потенциал слезной жидкости

Слезная жидкость используется в офтальмологии для диагностики некоторых патологических состояний органа зрения, в первую очередь, синдрома сухого глаза, так как именно изменения СЖ и слезных желез ведут к развитию данного заболевания. Проверка уровня секреции СЖ (тест Ширмера) и стабильности слезной пленки (проба Норна) позволяют с высокой точностью поставить диагноз «синдром сухого глаза». Однако, диагностический потенциал СЖ не ограничивается этим заболеванием. Анализ научной литературы свидетельствует о высокой информативности исследований физико-химических, биохимических и иммунологических параметров СЖ для диагностики и понимания патогенеза многих офтальмологических заболеваний (van Haeringen et al. 1989; Herber et al. 2001). Установлено, что офтальмологические заболевания ведут к дисбалансу содержания в СЖ цитокинов и факторов роста, активации синтеза специфических антител и к появлению биохимических маркеров воспаления (Stolwijk et al. 1994; Черных и др. 2006; Якушев и др. 2011). Так, было выявлено нарастание содержания лизоцима (Stolwijk et al. 1994) и фактора роста нервов (Park et al. 2008) в СЖ при развитии ДР. Повышение уровня иммуноглобулина Е (IgE) в СЖ свидетельствует о развитии аллергического

кератоконъюнктивита, причем изменение уровня IgE в СЖ происходит раньше, чем в крови, что обеспечивает более раннее выявление заболевания (Nomura et al. 1998). Обнаруженное повышение уровня провоспалительных цитокинов (Lema et al. 2005) в СЖ больных кератоконусом может указывать на связь заболевания с хроническими воспалительными процессами, несмотря на отсутствие воспаления в тканях роговицы у этих больных. Исследование белков СЖ, в частности концентрации аполипопротеина А1, позволило установить, что диабетическая и недиабетическая ретинопатия развиваются под действием разных факторов (Kawai et al. 2002).

Опубликованы данные об изменениях СЖ под влиянием различных лекарственных препаратов. Так, больные глаукомой вынуждены в течение длительного времени применять препараты, снижающие внутриглазное давление, что приводит к значительным повреждениям переднего эпителия роговицы и конъюнктивы и к повышению в СЖ концентрации провоспалительных цитокинов и матричной металлопротеиназы-9 (Malvitte et al. 2007). Нарушенный баланс про- и противовоспалительных цитокинов может привести к дегенерации клеток эпителия роговицы (Zhou et al. 2012). Таким образом, исследования СЖ развиваются в нескольких направлениях: поиск диагностических маркеров, оценка эффективности лекарственных средств и изучение механизмов возникновения офтальмологических заболеваний. Однако, решение этих задач осложняется рядом нерешенных методических проблем. В частности, не разработан стандартный метод сбора СЖ, а также определения протеома и липидома СЖ. Анализ литературы показал, что чаще всего для оценки протеома образцы СЖ получают, используя тест-полоски Ширмера или хирургический капилляр (Ohashi et al. 2006; Zhou et al. 2012), при этом образцы СЖ, собранные с помощью тест-полоски Ширмера и с помощью капилляра, различались по концентрации альбумина и трансферрина (Stuchell et al. 1984). Недавние работы по сравнению эффективности методов забора СЖ показали, что разные методы позволяют выявить различные белки. Так, тест-полоски Ширмера позволяют

определить 44 различных белка в СЖ, тогда как капиллярный метод сбора СЖ выявил 13 белков, и еще 30 были выявлены обоими методами (Green-Church et al. 2008). Таким образом, метод сбора существенно влияет на белковый состав СЖ.

Применение различных методов исследования белков приводит к тому, что качественный и количественный состав СЖ, определенный в разных лабораториях, отличается. Общая концентрация белка в составе СЖ, определенная разными методами, согласно литературным источникам, варьирует от 6 до 11 мг/мл (Ng et al. 2000; Zhou et al. 2012). Для разделения и определения белков в СЖ используют масс-спектрометрию, жидкостную хроматографию и двумерный электрофорез (Zhou et al. 2012).

Широкий спектр изменений состава СЖ делает её возможным универсальным индикатором нарушения обменных процессов при патологических состояниях органа зрения. Однако, подтверждение этой гипотезы требует проведения масштабных исследований, в том числе СЖ здоровых людей. Учитывая вариабельность состава СЖ, необходимо изучить влияние на её состав таких факторов, как возраст, пол и иммунологический статус людей, экологическая обстановка в месте их проживания.

Всестороннее исследование свойств, диагностического и прогностического потенциала СЖ предполагает привлечение новых методов, в частности морфологических. Морфологические характеристики СЖ, собранной во время слезоотделения, не изучены, хотя, очевидно, что СЖ содержит клетки и продукты их метаболизма и компоненты слезной пленки, которые могут быть исследованы с помощью электронной микроскопии. Одним из вопросов, индуцировавших данную работу четыре года назад, был вопрос о присутствии в СЖ экзосом, сообщения о выявлении этих внеклеточных везикул в СЖ в научной литературе отсутствовали. Экзосомы были выявлены в водянистой влаге (жидкость камер глаза) (Perkumas et al. 2007; Hoffmann et al. 2009) и стекловидном теле (Ragusa et al. 2015), и было интересно установить, есть ли они в СЖ. Диагностический потенциал

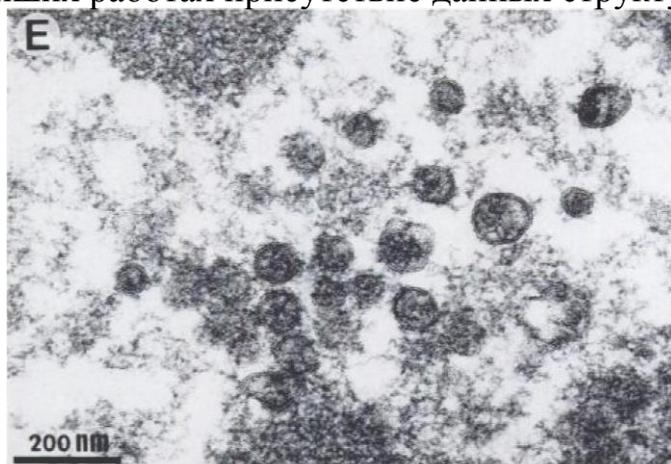
экзосом не подвергается сомнению (Lasser, 2015; Sato-Kuwabara et al. 2015), и исследование морфологических и молекулярно-биологических характеристик экзосом СЖ может помочь в разработке новых методов диагностики офтальмологических заболеваний и понимании механизмов их патогенеза.

#### **1.4 История изучения экзосом**

Структуры, которые сегодня называют «экзосомы», впервые были описаны в 1981 г. при изучении культур клеток (Trams et al. 1981). Исследование «судьбы» рецептора трансферрина в процессе дифференцировки ретикулоцитов показало, что они удаляются из клетки в составе мембраны небольших везикул (Pan et al. 1983a; Pan et al. 1983b). С помощью мечения рецептора к трансферрину было установлено, что участок плазмолеммы, содержащий рецепторы, эндоцитируется и доставляется в эндосому (Pan et al. 1984). Предполагалось, что затем из мембраны эндосомы образуются небольшие везикулы. Везикулы, вышедшие из клетки путем экзоцитоза и несущие рецептор к трансферрину, получили название «экзосомы» (Johnstone et al. 1987).

Присутствие экзосом в циркулирующей крови было установлено, когда был предложен метод выделения экзосом с помощью последовательных центрифугирований, который в настоящее время является самым распространенным методом выделения экзосом (Johnstone et al. 1989). В ранних работах для исследования свойств экзосом применяли следующие методы: (1) блоттинг с мечением молекул радиоактивными изотопами и иммуномечением, которые позволяли однозначно определить присутствие целевых молекул (например, рецептора трансферрина), и (2) электронную микроскопию, которая позволяет установить наличие мембраны (Johnstone et al. 1987; Johnstone et al. 1989) (рис. 1.2). На снимках, приведенных в данных работах отчетливо видно, что полученные образцы содержат не только

везикулы, но и некоторое количество филаментозных структур (рис. 1.2). Однако, в дальнейших работах присутствие данных структур не отмечается.



**Рис. 1.2.** Экзосомы, выделенные из крови овцы. Ультратонкие срезы. (Johnstone, 1989).

Так как экзосомы были «открыты» при исследовании дифференцировки ретикулоцитов, считалось, что они необходимы только для удаления «ненужных» клетке белков. Несколько лет спустя Raposo и коллеги на культуре клеток В-лимфоцитов показали участие экзосом в представлении антигенов (Raposo et al. 1996), что дало толчок к поиску других свойств экзосом. В 2007 г. в составе экзосом были обнаружены РНК, что позволило предположить участие экзосом в передаче информации между клетками (Valadi et al. 2007).

Передача информации между клетками лежит в основе жизнедеятельности организмов. В процессе эволюции, как прокариоты, так и эукариоты, выработали стратегии межклеточного взаимодействия, которые позволяют координировать и регулировать функционирование отдельных клеток. Считается, что микроорганизмы взаимодействуют внутри колонии, используя сигнальные молекулы, данное явление называется "чувство кворума" (*quorum sensing*) (Yanez-Mo et al. 2015) и позволяет микроорганизмам эффективно защищаться от неблагоприятных факторов. В многоклеточном организме клетки взаимодействуют путем прямого контакта (юкстакринная передача сигналов) или путем выделения во внеклеточную

среду различных молекул, включая нуклеотиды, липиды, короткие пептиды и белки. Эти молекулы воздействуют на выделившую их клетку (аутокринная передача сигналов), на соседние клетки (паракринная передача сигналов) или попадают в биологические жидкости и влияют на клетки других органов (эндокринная передача сигналов). После доставки к клетке-мишени сигнальные молекулы связываются с рецепторами на её поверхности и запускают каскад внутриклеточных реакций, которые влияют на процессы жизнедеятельности клетки. Однако, взаимодействие клеток не ограничивается передачей отдельных молекул, клетки выделяют в межклеточное пространство небольшие везикулы со сложноорганизованным и разнообразным содержимым – внеклеточные везикулы. Такой тип взаимодействия характерен как для прокариот, так и для эукариот: грамотрицательные бактерии отшнуровывают от внешней мембраны небольшие везикулы, которые так же служат для передачи сигнала от клетки к клетке; многоклеточные организмы выделяют в биологические жидкости разнообразные везикулы (Yanez-Mo, Siljander et al. 2015). Экзосомы - одна из групп внеклеточных везикул, несут высокоспецифичные маркеры состояния клетки-продуцента и способны доставлять свое содержимое к клетке-реципиенту, поэтому они привлекают наибольшее внимание исследователей.

Количество публикаций, посвященных изучению экзосом, возрастает с каждым годом. Показано, что экзосомы секретируются всеми типами клеток и присутствуют во всех биологических жидкостях, исследован белковый и липидный состав экзосом (Momen-Heravi et al. 2012; Yanez-Mo et al. 2015). Однако, несмотря на интенсивные исследования, формирование представлений о биологических свойствах экзосом происходит очень медленно, что обусловлено, в первую очередь, сложностью получения чистых препаратов экзосом и отсутствием экспериментальных методов прямого наблюдения процессов формирования экзосом и их секреции. Детальное изучение выделяемых клетками структур установило их гетерогенность, оказалось, клетки выделяют различные по размерам и

происхождению везикулы (Gould and Raposo 2013; Yanez-Mo, Siljander et al. 2015). До сих пор не существует стандартных методов выделения экзосом из различных биологических жидкостей, нет общепринятых определений каждого класса внеклеточных везикул. В 2011 году создано международное «Общество внеклеточных везикул» (International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) [www.isev.org/](http://www.isev.org/)), целью которого является создание единой номенклатуры внеклеточных везикул и стандартизация методов их выделения и исследования.

В ранних работах экзосомы описывались как определенная группа везикул, несущих специфические маркеры и присутствующих только в крови (Johnstone et al. 1987). Обнаружение везикул в других биологических жидкостях стало возможным после разработки методов их выделения и идентификации. В 2013 г международным «Обществом внеклеточных везикул» была принята следующая классификация внеклеточных везикул: первый тип везикул - экзосомы (exosomes), второй тип везикул - микровезикулы (microvesicles) / слущенные везикулы (shedding vesicles) / эктосомы (ectosomes) (данные названия являются синонимами и обозначают одну группу везикул), третий тип везикул - апоптотические тельца (apoptotic blebs) (Gould et al. 2013; Yanez-Mo et al. 2015).

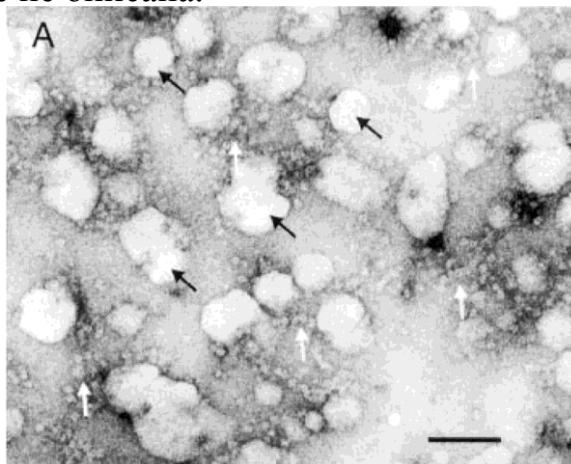
Введение единой классификации, однако, не решило проблему стандартизации образцов, под термином «экзосомы» разные исследователи по-прежнему подразумевают различные объекты. Ряд исследователей использует определение экзосом, как везикул, которые образуются в мультивезикулярных тельцах (МВТ) (Johnstone, Adam et al. 1987; Raposo, Nijman et al. 1996; Gould and Raposo 2013), другие полагают, что экзосомы - это все выделяющиеся из клеток везикулы, имеющие биологическую функцию (Trams, Lauter et al. 1981; Booth, Fang et al. 2006), третьи под термином «экзосомы» подразумевают все везикулы, которые осаждаются ультрацентрифугированием (Johnstone et al. 1987; Thery et al. 2006).

После выделения из клетки внеклеточные везикулы попадают в

биологические жидкости. Большинство биологических жидкостей содержат все типы внеклеточных везикул, а значит, выделяемые препараты состоят не только из экзосом. И, хотя специфические характеристики описаны для каждой группы везикул, до сих пор не существует надежного способа разделения популяций везикул.

Достоверность результатов исследования экзосом с помощью молекулярно-биологических методов ставится под сомнение еще и тем фактом, что, кроме везикулярных компонентов, образцы, полученные с помощью ультрацентрифугирования или коммерческих реагентов, обязательно содержат клеточные белки в виде компактных агрегатов (Lotvall et al. 2014). Однако, наличие таких примесей, способных исказить получаемые результаты, в большинстве случаев не учитывается авторами работ, посвященных исследованию свойств экзосом.

Например, в работе Skriner и соавторы описывают образцы, выделенные из синовиальной жидкости, и приводят снимки, полученные с помощью метода негативного контрастирования (рис. 1.3) (Skriner et al. 2006), на которых отчетливо видно, что препарат состоит не только из везикул, но и белковых комплексов. Однако, при анализе результатов этот факт не обсуждается. Морфология белковых комплексов, являющихся компонентом биологических жидкостей и попадающих в образец при выделении экзосом, в научной литературе не описана.



**Рис.1.3.** Образец, выделенный из синовиальной жидкости. Негативное контрастирование, длина масштабной линии соответствует 100 нм. Черными

стрелками отмечены везикулы, белыми - белковые комплексы (Skriner et al, 2006).

### **1.5 Механизмы формирования экзосом**

Все группы внеклеточных везикул имеют принципиально разные механизмы формирования: экзосомы формируются путем «специального» процесса из мембраны поздней эндосомы (Villarroya-Beltri et al. 2014), слущенные везикулы - при непосредственном отшнуровывании участков плазмолеммы вместе с цитоплазматическим содержимым (Choi et al. 2014), апоптотические тельца образуются из плазмолеммы во время апоптоза. Все уникальные свойства экзосом объясняются их образованием из мембраны поздних эндосом, именно эндосома определяет содержимое и дальнейшую судьбу экзосом. Система эндосом состоит из разных структур и отвечает за сортировку, активацию, блокирование и деструкцию захваченных путем эндоцитоза веществ, и таким образом осуществляет регуляцию многих процессов в клетке. В систему эндосом входят ранние, поздние и рециркулирующие эндосомы, каждая разновидность имеет специфические маркеры, морфологию и особую функцию. Часть поздних эндосом трансформируется в лизосомы.

В поздних эндосомах (мультивезикулярных тельцах, МВТ) образуются пузырьки размером 40-100 нм – интралюменальные везикулы (intraluminal vesicles) (van Meel et al. 2008). Показано, что формирование интралюменальных везикул в МВТ происходит за счет деформации мембраны эндосомы, которая изгибается в полость эндосомы и формирует везикулу (рис. 1.4). Отшнуровавшиеся от мембраны эндосомы везикулы (интралюменальные везикулы) накапливаются в МВТ (Johnstone et al. 1987; Villarroya-Beltri et al. 2014) и выделяются из клетки при слиянии мембраны МВТ с плазмолеммой (экзоцитоз) (Bobrie et al. 2011; Colombo et al. 2013; Record et al. 2014) во внеклеточное пространство поодиночке или в виде скоплений, после чего попадают в циркуляторное русло или

взаимодействуют с ближайшими клетками (Fitzner et al. 2011). Интралюменальные везикулы, покинувшие клетку, называются экзосомами.

Известно, что не все МВТ направляются по пути экзоцитоза, - накапливая гидролазы, МВТ может превратиться в лизосому или слиться с уже существующей лизосомой (рис. 1.4). Лизосомы – клеточные органеллы, ограниченные мембраной, функцией которых является разрушение находящихся внутри них молекул и частиц, в том числе – эндоцитированных (Luzio et al. 2007). На срезах лизосомы выглядят как округлые мембранные структуры размером около 1 мкм (de Duve, 2005). Основными маркерами лизосом являются кислые гидролазы, белки семейства LAMP и отсутствие рецептора маннозо-6-фосфата, что отличает лизосомы от поздней эндосомы (van Meel et al. 2008). Кислые гидролазы лизосом расщепляют белки, нуклеиновые кислоты и липиды.

Таким образом, МВТ делятся на две разновидности в зависимости от их основных функций: «деградирующие МВТ», в которых происходит расщепление белков цитоплазмы и эндоцитированного материала, и «секретирующие МВТ», выделяющие экзосомы во внеклеточное пространство (Piper et al. 2007; Record et al. 2011). Механизмы, определяющие «судьбу» МВТ не поняты, опубликованы лишь единичные работы, исследующие различия молекулярного состава секретирующих и деградирующих МВТ (Polansky et al. 1997; Borrás, 2014).

Итак, экзосомы - это везикулы, которые формируются из мембраны поздних эндосом, содержат участки цитоплазмы и выделяются жизнеспособной клеткой при экзоцитозе эндосомы (Gould et al. 2013; Record et al. 2014). Формирование экзосом контролируется эндосомально-лизосомальным аппаратом клетки, который обеспечивает отбор и доставку необходимых компонентов к месту отшнуровки будущей экзосомы (интралюменальной везикулы), что и определяет ее состав.

В составе экзосом обнаружен обширный набор белков, липидов и нуклеиновых кислот, который зависит от многих факторов; одни и те же

клетки могут продуцировать различные экзосомы в зависимости от условий внешней среды, состояния клеток или искусственной стимуляции (Yanez-Mo et al. 2015). Полагают, что каждая экзосома несет уникальную информацию, не существует универсальной экзосомы, которая обеспечивала бы необходимый ответ клетки-реципиента во всех случаях.

Эпителиальные клетки выделяют различные по составу экзосомы с базальной и апикальной стороны клеток, а также в ответ на стимуляцию (Sreekumar et al. 2010; Palma et al. 2012). Существование различных популяций экзосом, выделяющихся с базальной и апикальной стороны эпителия свидетельствует о гетерогенности везикул в выделяемых образцах и наличии тонких механизмов, регулирующих отбор молекул для упаковки в экзосомы. Необходимо учитывать наличие различных популяций в пуле секретлируемых экзосом при выделении их из биологических жидкостей: субпопуляции экзосом, выделенные из культуральной жидкости одной линии, различаются по составу белков, липидов и нуклеиновых кислот (Ferguson et al. 2016).

Следует отметить, что часть молекул присутствует в экзосомах всегда, так как необходима для их формирования и «правильного» функционирования. Критическими для формирования экзосомы являются небольшие ГТФазы семейства Rab, которые отвечают за выделение экзосом из клетки-продуцента, заякоривание и слияние мембран экзосом с клеткой-реципиентом (Corbeel et al. 2008). Аннексины и тетраспанины (CD63, CD81 и CD9) служат для узнавания мембраны экзосомы клеткой-реципиентом и их слияния (Futter et al. 2007; Mathivanan et al. 2010). Основными маркерами экзосом считают также белки Alix, TSG101, и белки теплового шока (HSP70) (Mathivanan et al. 2010; Mathivanan et al. 2012). Экзосомы содержат широкий набор липидов, в состав их мембраны входят холестерол, сфингомиелин, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин (Record et al. 2014). Липидный состав экзосом клеток разных линий варьирует: экзосомы клеток рака предстательной железы содержат большое количество холестерола (Llorente

et al. 2013), в то время как в экзосомах олигодендроцитов содержание холестерина очень низкое (Kramer-Albers et al. 2007).

Присутствие нуклеиновых кислот не является критичным для формирования экзосом, однако, именно РНК зачастую играют ключевую роль в клеточной коммуникации (Jenjaroenpun et al. 2013; Mimeault and Batra 2014; Thakur et al. 2014). В экзосомах обнаружен большой набор РНК и, помимо мРНК (функциональной и в виде фрагментов), экзосомы содержат большое количество некодирующих РНК: микроРНК, рибосомальная РНК, транспортная РНК, РНК вольтов, и др., размер которых не превышает 700 нуклеотидов (Lasser et al. 2011; Ferguson et al. 2016). Свойства некоторых РНК, обнаруженных в экзосомах, до конца еще не изучены. Например, предполагается, что переносимые экзосомами РНК, входящие в состав вольтов (vt-RNA), действуют по механизму сходному с микроРНК и участвуют в регуляции трансляции (Hussain, Sajini et al. 2013), однако, напрямую это не показано.

Наличие РНК в экзосомах выявлено во многих исследованиях, тогда как данные о присутствии в экзосомах ДНК отрывочны и противоречивы. Долгое время считалось, что ДНК в образцах экзосом обнаруживается вследствие контаминации апоптотическими тельцами (Record et al. 2011). В дальнейшем в экзосомах опухолевых клеток были выявлены геномная и митохондриальная ДНК (Kahlert et al. 2014; Thakur et al. 2014). Считалось, что образцы экзосом здоровых людей не содержат ДНК, однако, детальное исследование состава экзосом плазмы крови здоровых людей, включающее секвенирование, показало, что они так же содержат ДНК (Thakur et al. 2014). Так как долгое время присутствие ДНК в экзосомах считалось артефактом, функции ДНК экзосом не исследованы, опубликованы лишь данные об участии переносимой экзосомами митохондриальной ДНК в развитии заболеваний, связанных с мутациями в геноме митохондрий (Guescini et al. 2010).

Формирование экзосом из мембраны поздних эндосом (Johnstone et al.

1987; Villarroya-Beltri et al. 2014) обуславливает повышенный интерес к изучению свойств мембраны этих органоидов, для чего необходимо понимание процессов эндоцитоза, вследствие которого участки мембраны переносятся из плазмолеммы и встраиваются в мембрану эндосом (рис. 1.4). Термин «эндоцитоз» обобщает процессы интернализации различных веществ путем инвагинации плазмолеммы с последующим замыканием и отшнуровкой эндоцитозного пузырька (везикулы). Процессы эндоцитоза опосредуют практически все аспекты жизнедеятельности клеток: передачу сигналов, регуляцию клеточного метаболизма, активацию защитных реакций, они контролируют состав плазмолеммы и форму клетки, обеспечивают взаимодействие клетки с внешней средой (Doherty et al. 2009). Выделяют два больших класса эндоцитоза, обеспечивающих (1) интернализацию микродоменов плазматической мембраны в виде небольших (около 100 нм) везикул или трубочек (микроэндоцитоз) и (2) интернализацию макродоменов плазматической мембраны - макроэндоцитоз (Canton et al. 2012). Клатрин-зависимый эндоцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз, клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз (рафт-зависимый эндоцитоз) относят к первому типу, фагоцитоз, макропиноцитоз и эндоцитоз, связанный с циркулярными дорзальными складками – ко второму (Canton et al. 2012). Изучение липидного состава мембраны экзосом показало его схожесть с мембраной липидных рафтов – участков плазмолеммы с особой структурой (Pelkmans 2005). Липидные рафты представляют собой асимметричный бислой, в котором сфинголипиды локализованы во внешнем слое мембраны, а глицерофосфолипиды (фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин) - во внутреннем (Rajendran et al. 2005). В рафтах так же содержится большое количество холестерина. До сих пор не установлено, идет ли отбор молекул для создания «рафт-подобной» мембраны экзосом внутри мембраны эндосомы, или же используются рафты, пришедшие от плазмолеммы в процессе эндоцитоза.

Предполагается, что существует два источника молекул, попадающих в

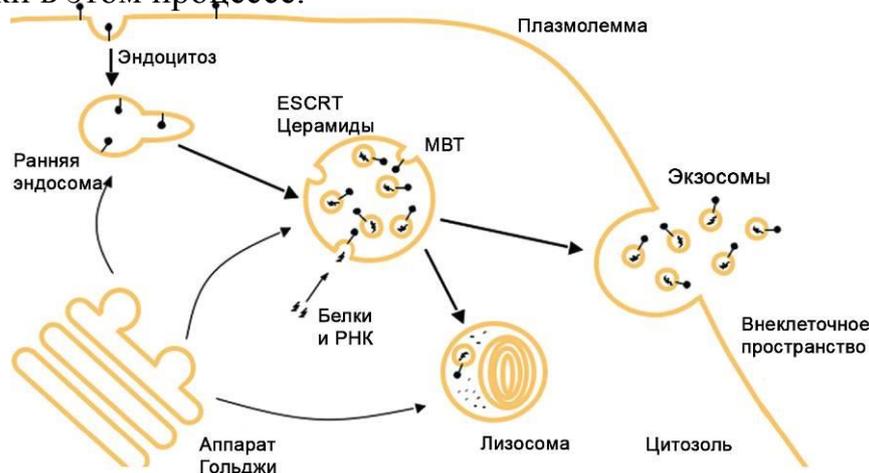
экзосому: молекулы, находящиеся в мембране эндосомы и молекулы, входящие в состав участка цитоплазмы, захваченного при отшнуровке везикулы. Липиды и трансмембранные белки попадают в экзосомы из мембраны эндосомы, нуклеиновые кислоты и белки, переносимые в полости экзосом, частично неспецифическим образом, захватываются из цитоплазмы (рис. 1.4). Остальные белки и нуклеиновые кислоты, вероятно, являются результатом направленного отбора с помощью специальных белков. Механизмы специфического отбора молекул в экзосомы являются предметом пристального внимания исследователей, однако, четкого понимания этого процесса не достигнуто.

В мембране ранних эндосом идентифицирован молекулярный комплекс ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), состоящий из 4-х субъединиц (0–III) (Hardy et al. 2005), к предполагаемым функциям которого относят распознавание убиквитинированных белков и направление их в экзосомы (Villarroya-Beltri et al. 2014), так же он участвует в финальных стадиях разделения мембран (Boura et al. 2012) и формировании интралюменальных везикул в МВТ. Несмотря на то, что моноубиквитинирование служит сигналом для направления белков в МВТ, не все белки в экзосомах убиквитинированы (Tuft et al. 1989), что может свидетельствовать о наличии других вариантов отбора молекул. При блокировании компонентов ESCRT-комплекса инвагинацию мембраны внутрь эндосомы и последующее отшнуровывание везикулы обеспечивают специфические домены, богатые церамидами, холестерином, сфинголипидами и флотилином (Trajkovic et al. 2008; Villarroya-Beltri et al. 2014). Таким образом, ESCRT-комплекс совместно со специфическими липидами осуществляют отбор молекул в экзосомы (рис. 1.4).

Механизмы специфического отбора РНК в экзосомы на сегодняшний день точно не установлены, однако, обнаружены специфические последовательности в составе РНК, которые повышают вероятность их упаковки в экзосомы: микроРНК содержат экзо-мотив (exo-motif), который

отвечает за связывание микроРНК с особым рибонуклеопротеином A2B1, контролирующим упаковку РНК в экзосомы (Villarroya-Beltri et al. 2014); мРНК доставляется в экзосомы, если содержит специфичные нетранслируемые области на 3' конце (Batagov et al. 2013). Считается, что белок Annexin-2 так же участвует в доставке РНК в экзосомы, поскольку связывает РНК и в большом количестве выявляется в экзосомах (Filipenko et al. 2004). Экспериментальные данные показывают, что экзосомы каждого типа клеток содержат уникальные белки, связывающие нуклеиновые кислоты. Понимание причин такой высокой специфичности, возможно, поможет понять механизмы отбора нуклеиновых кислот в экзосомы (Ferguson et al. 2016). Механизмы, обеспечивающие доставку в экзосомы ДНК, не изучены.

Исследованию состава экзосом, выделенных из различных жидкостей, посвящено большое количество работ, тем не менее, закономерности формирования экзосом клетками требуют дальнейшего тщательного изучения, в частности, развития методов прижизненной визуализации, которые помогут получить прямые доказательства участия тех или иных структур клетки в этом процессе.



**Рисунок 1.4.** Формирование экзосом, эндосомально-лизосомальная система. МВТ – мультивезикулярное тельце (поздняя эндосома). ESCRT - endosomal sorting complex required for transport. (Bobrie, 2011)

## 1.6 Взаимодействие экзосом с клетками-реципиентами

Экзосомы, выделившись во внеклеточное пространство, циркулируют в организме до «встречи» с клетками-реципиентами. Полагают, что экзосомы способны «находить» клетки-реципиенты и избирательно передавать сигнал от клетки-продуцента. Разные типы клеток используют для взаимодействия с экзосомами разные молекулы адгезии (Miyanishi et al. 2007; Nazarenko et al. 2010). Например, лимфоциты используют белок Tim4 (Miyanishi et al. 2007), тогда как интегрин CD49d и тетраспанин Tspan8 задействованы в связывании экзосом с эндотелиоцитами (Nazarenko et al. 2010). Несмотря на активные исследования, многое остается невыясненным в механизмах адресной доставки, проникновения экзосом в клетки-мишени и способах «отправки» содержимого экзосом к целевому компартменту клетки.

Взаимодействие экзосом с клетками-реципиентами начинается с распознавания рецепторов на их поверхности. Связывание экзосом с поверхностью клетки требует наличия таких молекул адгезии, как интегрины (CD91) со стороны клетки и тетраспанины (CD63) со стороны экзосом (Skokos, Votros et al. 2003; Villarroya-Beltri, Baixauli et al. 2014). Экспериментально показано, что экзосомы несут на своей поверхности лиганды, которые могут связываться с рецепторами на плазмолемме и запускать в клетке синтез вторичных посредников. В этом случае лиганд-рецепторное взаимодействие экзосомы и клетки происходит по механизму, сходному с гормонами (Ogorevc et al. 2013), например, активируются пути, зависящие от  $Ca^{2+}$  и митоген-активируемой протеинкиназы (Calzolari et al. 2006).

Взаимодействие экзосом и клетки-реципиента не ограничивается лиганд-рецепторным вариантом, который, в частности, не объясняет, каким образом мРНК, содержащиеся внутри экзосом, становятся доступными для трансляции в клетке-реципиенте, трансляция доставленной экзосомами мРНК показана экспериментально (Valadi et al. 2007). Проникновение

экзосом в клетку может происходить путем слияния с плазмолеммой, строение мембраны экзосомы позволяет ей напрямую сливаться с плазмолеммой. Однако, считается, что слияние мембраны экзосомы с плазмолеммой происходит редко, поскольку при нейтральных рН внеклеточной среды мембрана экзосом слишком «жесткая» (Pelkmans, 2005; Subra, Laulagnier et al. 2007). Экзосома, как и любая другая частица, может проникать в клетку путем эндоцитоза. Полагают, что именно эндоцитоз является основным способом проникновения экзосом в клетку (Yanez-Mo et al. 2015), однако, прямых доказательств этого процесса не опубликовано.

У каждой частицы или макромолекулярного комплекса есть свой набор «путей» внутрь клетки. Большинство поступающих в клетку частиц могут использовать любой вариант эндоцитоза для проникновения, но есть частицы, которые могут быть интернализированы посредством только определенного типа эндоцитоза. Все типы эндоцитоза нуждаются в координированном взаимодействии белков, обеспечивающих искривление мембраны, формирование углубления и отшнуровку эндоцитозного пузырька (везикулы) от плазмолеммы и его взаимодействие с цитоскелетом. Какой тип эндоцитоза используется экзосомами, точно не установлено, возможно, «путь» экзосом в клетку зависит от типа клетки-реципиента (Yanez-Mo et al. 2015). Так, клетки глиобластомы захватывают экзосомы посредством фагоцитоза (Christianson et al. 2013), а в процессе интернализации экзосом клетками микроглии задействован макропиноцитоз (Fitzner et al. 2011). Размеры экзосом предполагают их интернализацию посредством микроэндоцитоза, однако, данные о проникновении экзосом в клетку посредством эндоцитоза микродоменов плазмолеммы не опубликованы, данный вопрос требует дальнейших исследований.

Неизвестна «судьба» экзосом после интернализации. Предполагается, что после проникновения в клетку путем эндоцитоза экзосомы, как и другие частицы, попадают в эндосому, однако, экспериментальных доказательств этого процесса не опубликовано. Постановка эксперимента для проверки

данного феномена требует разработки новых способов мечения экзосом и привлечения более совершенных методов визуализации.

Исходя из хорошо известных механизмов эндоцитоза, экзосома, вовлеченная в процесс микроэндоцитоза, должна попасть в раннюю эндосому. Полость эндосомы отграничена от цитоплазмы мембраной, поэтому необходимо наличие механизмов, позволяющих экзосомам «доставить» свое содержимое в цитозоль клетки-мишени. Предполагается, что «доставка» осуществляется путем слияния мембраны экзосомы с мембраной эндосомы. Величина рН в эндосоме (5,5-6) является благоприятной для слияния мембраны экзосомы с мембраной эндосомы и «выхода» содержимого экзосомы в цитозоль.

Механизмы взаимодействия экзосом с клетками вызывают огромный интерес как исследователей экзосом, так и представителей других направлений науки. Недостаток экспериментальных данных приводит к тому, что обсуждение этих механизмов в научной литературе носит в основном умозрительный характер, а для их понимания требуется тщательное изучение процессов эндоцитоза и функционирования эндосомально-лизосомальной системы.

Экзосомы играют важную роль в регуляции жизнедеятельности клеток, поэтому уровень экзосом в организме должен жестко контролироваться, деградация экзосом должна находиться в равновесии с их секрецией. Очевидно, что поддержание оптимального количества циркулирующих экзосом достигается за счет их постоянной секреции и выведения. Данный аспект «жизненного цикла» экзосом в полной мере не изучен. Считается, что особенности состава экзосом обеспечивают их сохранность в биологических жидкостях. Опубликованы данные, что время циркуляции экзосом в биологических жидкостях зависит от типа клеток-продуцентов (Yanez-Mo, Siljander et al. 2015). Лизофосфатидилхолин, содержащийся в экзосомах, «направляет» экзосомы в лимфатические узлы, где они могут сохраняться долгое время (Luketic et al. 2007). К предполагаемым механизмам выведения

относят захват агрегатов экзосом макрофагами (Blanc et al. 2007), однако, он происходит редко, в большей степени выведение экзосом из биологических жидкостей происходит за счет их захвата клетками-реципиентами (Yanez-Mo et al. 2015).

Несмотря на большое внимание, уделяемое механизмам взаимодействия экзосом с клетками, неизвестно, какой из трех возможных механизмов проникновения экзосом в клетку является доминирующим и какие факторы регулируют реализацию «сигнала» экзосом в клетке-мишени. Многочисленными исследованиями показано, что в образование и секрецию экзосом вовлечены сложнейшие многокомпонентные белковые комплексы, а также специфические липидные микродомены мембран и, хотя размер экзосом менее 100 нм, они являются транспортёрами большого количества молекул, необходимых для передачи комплексных сигналов между клетками и являются незаменимым участником регуляции гомеостаза. Удивительно, что такая небольшая компактная структура, как экзосома, может изменять функциональное состояние клеток самыми разными способами, вовлекая в этот процесс все системы клетки и регулируя различные физиологические и патологические процессы в организме.

### **1.7 Экзосомы – транспортёры биологически активных молекул. Перспективы использования экзосом в клинической практике**

Экзосомы представляют собой комплексное молекулярное «сообщение» от одной клетки другим, они насыщены регуляторными молекулами, поэтому функции экзосом многочисленны и разнообразны, показано участие экзосом во многих процессах, протекающих в организме. Опубликованы данные об участии экзосом в регуляции иммунного ответа, дифференцировки клеток, процессов коагуляции крови и ангиогенез, метаболизма тканей и их регенерации (Yanez-Mo et al. 2015; McCoy-Simandle et al. 2016; Merino-Gonzalez et al. 2016).

Кроме структурных белков и липидов, в экзосомах присутствуют регуляторные белки и липиды. Регуляторные белки экзосом делятся на два типа: трансмембранные белки, которые воздействуют на клетку путем лиганд-рецепторного взаимодействия, и белки, находящиеся в полости экзосом, которые воздействуют на клетку, попадая внутрь путем эндоцитоза. В частности, в полости экзосом переносятся цитокины (MacKenzie et al. 2001; Bhatnagar et al. 2007a; Bhatnagar et al. 2007b). Несмотря на активное изучение функций белков экзосом, не выяснено, какие белки отвечают за ту или иную функцию экзосом и является ли полученный эффект результатом комплексного действия многих белков или нескольких высокоактивных.

В составе мембраны экзосом обнаружены регуляторные липиды - эйкозаноиды и ферменты их метаболизма, простагландины, жирные кислоты и холестерол (Thery et al. 2006; Esser et al. 2010; Subra et al. 2010). Функцией входящих в состав экзосом липидов также является усиление лиганд-рецепторного взаимодействия трансмембранных белков экзосом и поверхностных рецепторов клетки путем расщепления фосфолипидов мембраны экзосом с образованием вторичных посредников липидной природы (Subra et al. 2010).

Уникальным свойством экзосом является их способность к транспортировке и адресной доставке нуклеиновых кислот: экзосомы переносят большое количество различных РНК, которые изменяют уровень экспрессии белков клеток-реципиентов, в частности, мРНК. «Экзосомальные» мРНК участвуют в дифференцировке клеток, клеточной пролиферации и регуляции иммунного ответа (Bruno et al. 2009), играют роль в поддержании гомеостаза и синхронизации функционального состояния клеточной популяции (Eldh et al. 2010). До сих пор не установлено, действует ли мРНК опосредованно через трансляцию и образование белка, или же фрагменты мРНК регулируют уровень трансляции определенных белков в клетке (Yanez-Mo et al. 2015).

Помимо мРНК, экзосомы содержат некодирующие РНК, наибольший

интерес представляют микроРНК – небольшие (около 20 н.) одноцепочечные РНК, которые комплементарно связываются с мРНК и приводят к ее деградации или ингибированию трансляции, что может изменить уровень экспрессии и фенотип клеток-реципиентов (Yanez-Mo et al. 2015). Опубликованы данные об участии микроРНК экзосом в развитии иммунного ответа, дифференцировке клеток (Ismail et al. 2013), созревании фолликулов и рекрутировании клеток из костного мозга (Santonocito et al. 2014; Xu et al. 2014), микроРНК вовлечены во взаимодействие между нейронами и астроцитами в центральной нервной системе (Morel et al. 2013).

Наибольший интерес вызывают исследования, показавшие участие экзосом в развитии и метастазировании опухолей. Множество публикаций посвящено изучению свойств экзосом, выделяемых опухолевыми клетками. Опубликованы данные, свидетельствующие, что клетки опухоли «используют» экзосомы для воздействия на здоровые клетки организма, направленного на «облегчение» жизнедеятельности клеток опухоли и подавление функций других клеток, в частности, иммунной системы (Ciardiello et al. 2016). Экзосомы опухолевых клеток играют ключевую роль в модуляции иммунного ответа на опухолевую инвазию (Huber et al. 2005; Hoshino et al. 2013), стимулируют образование кровеносных сосудов, необходимых клеткам опухоли, испытывающим постоянную гипоксию (Mimeault et al. 2014). Опубликованы данные, свидетельствующие об участии экзосом в распространении метастазов. Так, клетки глиобластомы выделяют экзосомы, в состав которых входят особые мРНК, некодирующие РНК и ДНК, способные изменять уровень экспрессии генов клеток-мишеней, что приводит к ускоренному росту и метастазированию опухоли (van der Vos et al. 2011).

Роль экзосом в развитии патологических состояний не ограничивается участием в жизнедеятельности опухолевых клеток, есть данные о вовлечении экзосом в развитие нейродегенеративных заболеваний. Недавние исследования показали, что экзосомы переносят  $\alpha$  и  $\beta$  амилоиды, являющиеся

причиной амилоидозов (Tasaki et al. 2010) и болезни Альцгеймера (Takahashi et al. 2002), и способствуют распространению прионов – особых белков с нарушенной третичной структурой (Izquierdo-Useros et al. 2009; Vlassov et al. 2012).

Первоначально считалось, что экзосомы необходимы только для удаления «ненужных» клетке белков, липидов и нуклеиновых кислот. Однако, накопление знаний об экзосомах изменило эту точку зрения и привело к разработке концепции экзосом, как переносчиков биологических сигналов (Valadi et al. 2007). С тех пор предпринимаются попытки использовать уникальные свойства экзосом в клинической практике. Исследования ведутся в трех направлениях: использование экзосом в качестве «доставщиков» лекарственных средств, использование биологических свойств немодифицированных экзосом и поиск диагностических маркеров различных заболеваний.

Эффективное лечение некоторых заболеваний требует адресной доставки терапевтических молекул в клетки, соответствующие «доставщики» должны защищать препарат от воздействия агрессивных факторов биологических жидкостей, обеспечивать его биологическую доступность и адресацию препарата именно тем клеткам, которые в нем нуждаются. Отдельной задачей этих разработок является обеспечение проникновения препарата в клетку. Экзосомы предстают «идеальными» доставщиками: их содержимое защищено мембраной, имеющей все необходимые компоненты для распознавания клетки-реципиента и доставки молекул внутрь клетки. Несомненно, экзосомы имеют преимущество перед искусственно сконструированными липосомами, созданными на основе фосфолипидов и холестерина. Однако, попытки поместить какой-либо препарат внутрь экзосом пока не увенчались успехом. Опубликована работа, сообщающая о «нагрузке» экзосом куркумином (полифенол, обладающий противовоспалительным, антиоксидантным и противоопухолевым действием), однако, приводимые авторами данные вызывают сомнения (Sun

et al. 2010). Перспективным считается использование экзосом и в роли «доставщиков» РНК. Однако, эффективные методы загрузки РНК в экзосомы находятся на стадии разработки. Существующие методы, например, электропорация или инкубация клеток в присутствии высокой концентрации целевой молекулы, имеют много недостатков: низкую эффективность, позволяют загружать только небольшие молекулы (микроРНК), не обладают достаточной специфичностью загрузки (Alvarez-Erviti et al. 2011; Ohno et al. 2013). Для повышения специфичности в целевые молекулы РНК вводят особые последовательности – экзо-мотивы (Exomotifs), которые отвечают за упаковку РНК в экзосомы (Villarroya-Beltri et al. 2013). Несмотря на многообещающие публикации, ни одного препарата, разработанного на основе экзосом, нагруженных целевыми молекулами, в клиническую практику не введено.

Результаты исследований, проведенных в последние годы, свидетельствуют о перспективности использования немодифицированных экзосом в клинической практике. Положительные результаты получены при изучении влияния экзосом мезенхимальных стволовых клеток на течение сердечно-сосудистых заболеваний (Ferguson et al. 2016). Введение экзосом мезенхимальных стволовых клеток значительно уменьшало область поражения миокарда у мышей после инфаркта (Arslan et al. 2013). Вероятно, это связано с тем, что экзосомы стволовых клеток содержат мРНК, кодирующую белок TGF- $\beta$ 1, который инициирует регенерацию тканей, активируя фибробласты (Borges et al. 2013). Активно разрабатывается область использования экзосом дендритных клеток в качестве "вакцины" против опухолевых заболеваний (Natasha et al. 2014). Предполагается, что антигены опухолевых клеток могут быть представлены Т-клеткам с помощью экзосом, выделенных из дендритных клеток (Natasha et al. 2014). Введение модифицированных таким образом экзосом онкологическим больным вызывает стимуляцию иммунного ответа, направленного против опухоли. Были сообщения о клинических испытаниях препаратов экзосом

при лечении различных видов злокачественных заболеваний (Pitt et al. 2014; Narita et al. 2015), однако, на сегодняшний день нет сообщений об успешном их завершении.

Наиболее разработанным направлением исследований экзосом является поиск диагностических маркеров различных заболеваний (Lasser et al. 2011; Stamer et al. 2011; Prunotto et al. 2013). Предполагается, что экзосомы каждой биологической жидкости несут информацию о функциональном состоянии той системы организма, которая участвует в их образовании (Zhou et al. 2006; Takata et al. 2008). Наиболее широко используемыми объектами диагностических исследований являются моча и кровь (Li et al. 2014; Lasser 2015), однако, ведется поиск соответствующих диагностических маркеров в экзосомах, выделенных из слюны, ликвора, молока, семенной жидкости и других (Lasser et al. 2011; Spielmann et al. 2011; Street et al. 2012; Yanez-Mo et al. 2015).

Наибольшее количество работ, посвященных поиску диагностических маркеров, направлено на изучение экзосом опухолевых клеток. Показано, что экзосомы, выделяемые опухолевыми клетками, несут специфические маркеры и значительно отличаются от экзосом здоровых клеток по многим показателям (Palma et al. 2012; Ogorevc et al. 2013). Например, из экзосом крови были выделены микро-РНК, специфичные для клеток рака легких, рака предстательной железы, колоректального рака и рака мочевого пузыря (Chen et al. 2008; Mitchell et al. 2008; Nagata et al. 2016). Экзосомы, секретлируемые клетками рака желудка, содержат многочисленные факторы, которые «облегчают» разрастание и метастазирование опухоли и могут стать универсальными маркерами опухолевых заболеваний и основой для их таргетной терапии (Zhong et al. 2016).

Несмотря на потенциал экзосом, как специализированных доставщиков и естественных регуляторов, использование их в этом качестве в клинической практике пока представляется проблематичным. В первую очередь это связано с тем, что обычно исследуются смешанные препараты разных

субпопуляций экзосом, не учитывается их гетерогенность, а также присутствие «невезикулярных» компонентов, которые также могут быть носителями биологически активных молекул. До сих пор невозможно выделить отдельные субпопуляции экзосом, необходима разработка новых методических подходов для решения этой проблемы, что позволит исследователям понять, опосредован ли терапевтический эффект участием всего пула экзосом, или отдельные субпопуляции экзосом оказывают специфическое и, временами, нежелательное действие. Несмотря на то, что попытки внедрить использование экзосом в клиническую практику ведутся с 2002 г., до сих пор не разработан ни один лекарственный препарат, использующий свойства экзосом.

### **1.8 Исследования экзосом в офтальмологии**

Область возможного применения экзосом включает восстановительную медицину и регенерацию тканей, лечение опухолевых заболеваний и заболеваний, связанных с развитием воспаления. Исследования экзосом, связанных с органом зрения и его заболеваниями, несопоставимы по объему с исследованиями экзосом других систем организма. Тем не менее, опубликован ряд работ, результаты которых свидетельствуют о перспективности изучения экзосом органа зрения и их применения в офтальмологии. Исследование свойств экзосом позволило пролить свет на некоторые вопросы функционирования органа зрения здоровых людей и пациентов с различными заболеваниями. Так, установлено, что экзосомы участвуют в передаче информации между клетками пигментного эпителия и сетчатки (Locke et al. 2014). Экзосомы, вероятно, обеспечивают сохранность циркулирующих в стекловидном теле микро-РНК, так как большая часть микро-РНК, выделяемых из стекловидного тела, совпадает с микро-РНК экзосом стекловидного тела (Ragusa et al. 2015). Экзосомы были выделены из культуральной жидкости клеток пигментного эпителия сетчатки (Locke et al.

2014), стекловидного тела (Ragusa et al. 2015), водянистой влаги (Dismuke et al. 2015), и нами - из слезной жидкости (Григорьева и др. 2016) и использованы для поиска диагностических и прогностических маркеров офтальмологических заболеваний. Наибольший интерес с точки зрения диагностики представляет исследование микро-РНК, переносимых экзосомами. Сравнение состава микро-РНК образцов экзосом стекловидного тела пациентов с увеальной меланомой выявило повышение уровня miR-146a по сравнению со здоровыми людьми (Ragusa et al. 2015). Изучение молекулярных механизмов развития глаукомы привело к открытию белка миоцилина, мутации в гене MYOC, кодирующем миоцилин, обнаруживаются у 3 % больных первичной открытоугольной глаукомой (Borras, 2014). Ген MYOC экспрессируется в клетках трабекулярной сети, ганглиозных клетках сетчатки и клетках пигментного эпителия (Polansky et al. 1997; Tamm et al. 1999; Hardy et al. 2005) и соответствующий белок выделяется во внеклеточное пространство с помощью экзосом (Hardy et al. 2005). Известно, что диабетическая ретинопатия и возрастная дегенерация макулы сопровождаются образованием новых сосудов, стенка которых имеет повышенную проницаемость, что приводит к отеку тканей (Gerber et al. 2015). Применение препаратов, препятствующих ангиогенезу (Hwang et al. 2016), значительно снижает скорость потери зрения, однако, их совершенствование требует понимания молекулярных механизмов развития данных заболеваний. В экзосомах, выделенных из плазмы крови больных возрастной дегенерацией макулы, изменялся уровень микроРНК-361, микроРНК-301 и микроРНК-424, вовлеченных в регуляцию ангиогенеза (Grassmann et al. 2014), которые могут стать мишенью для разработки лекарств, препятствующих неоваскуляризации при возрастной дегенерации макулы и диабетической ретинопатии. Опубликованные данные об экзосомах органа зрения и их компонентах свидетельствуют, что исследование экзосом жидкостей глаза может помочь не только в разработке новых методов диагностики, но и прояснить механизмы, лежащие в основе патогенеза

офтальмологических заболеваний.

## 1.9 Заключение

Офтальмологические заболевания, особенно ведущие к слепоте, являются одной из важнейших проблем современной медицины. Несмотря на значительный прогресс методов офтальмологии, особенно – микрохирургии, многие аспекты патогенеза и этиологии офтальмологических заболеваний остаются невыясненными. Серьезной проблемой является отсутствие эффективных методов ранней диагностики заболеваний, затрагивающих глубокие структуры глаза. Прямое исследование глубоких структур глаза затруднено, так как может привести к необратимому повреждению органа зрения. Единственным субстратом для диагностики заболеваний органа зрения, доступным атравматично, является слезная жидкость (СЖ). Однако, работы, посвященные исследованию диагностического потенциала СЖ, немногочисленны.

Тесты, основанные на использовании физических свойств СЖ, достаточно широко используются в клинической практике для диагностики заболеваний, связанных с поверхностью глаза. На стадии разработки находятся методы оценки состояния структур органа зрения, основанные на биохимических и иммунологических характеристиках СЖ. В офтальмологической практике широко применяются методы визуализации структур глаза: офтальмоскопия - для исследования глазного дна, биомикроскопия - для осмотра поверхности роговицы и конъюнктивы, кристаллография - для оценки содержания солей в СЖ (Белоглазов и др. 2003). Однако, исследования клеток и субклеточных компонентов СЖ морфологическими методами не опубликованы.

Мы полагаем, что СЖ может стать ценным источником диагностической информации разного уровня, включая внеклеточные везикулы, которые в соответствии с современными представлениями, являются важнейшими

носителями информации. Внеклеточные везикулы выявлены во всех жидкостях организма, однако, прямых доказательств их присутствия в СЖ не было опубликовано до появления наших работ. Выявление и комплексное исследование внеклеточных везикул СЖ является актуальной задачей, так как они могут стать не только источником диагностической информации, но и помочь пониманию механизмов патогенеза офтальмологических заболеваний. Другие компоненты СЖ (клетки и субклеточные структуры) также заслуживают пристального внимания, как возможный источник информации о процессах, происходящих на передней поверхности глаза и в слезном аппарате и, возможно, в глубоких структурах глаза. Слезная жидкость может стать универсальной информационной системой, отражающей функциональное состояние всех тканей органа зрения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Реагенты

В работе были использованы следующие реагенты: фосфатный буфер (0,01 М; pH 7,3-7,5; Росмедбио, Россия), буфер трис-НСl (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-НСl, pH 7,5), цитрат натрия (Fluka, США), уранилацетат (Fluka, США), фосфорновольфрамовая кислота (Fluka, США), четырехокись осмия (SPI-CHEM™, США), бычий сывороточный альбумин (БСА, 66 кДа, Sigma-Aldrich, США), формвар (SPI-CHEM™, США) дихлорэтан (Fluka, США), Milli-Q-дистиллированная вода (18МОм/см), раствор Хэнкса (Life Technologies, США). В работах с культурами клеток использованы следующие культуральные среды: среда Eagle в модификации Dulbecco (DMEM) (Gibco, Германия) и среда Dulbecco в модификации Iscove (IMDM) (Gibco, Германия). Для заливки образцов использовали эпоксидные смолы эпон и аралдит (SPI-CHEM™, США).

### 2.2 Сбор слезной жидкости

Для забора СЖ слезоотделение стимулировали внесением в конъюнктивальный мешок 2-3 мг порошка альбуцида (сульфацетамид натрия моногидрат, DOSFARM, Казахстан). Слезотечение начиналось немедленно после внесения альбуцида. С помощью стерильного хирургического капилляра из нижнего свода глаза выделяющуюся жидкость собирали в стерильную сухую пробирку. Сбор СЖ проводился врачом-офтальмологом МНТК А.В.Ереминой. У каждого пациента СЖ собиралась однократно и только из одного глаза: у больных офтальмологическими заболеваниями забор СЖ производился до хирургического вмешательства. Диагноз ставился

в МНТК «Микрохирургия глаза» врачами-офтальмологами при первичном осмотре пациентов.

Образцы СЖ были получены от 44 здоровых людей (на момент забора СЖ признаки офтальмологических заболеваний при визуальном осмотре отсутствовали) в возрасте 40-60 лет, 23 женщины и 21 мужчина. Данный возрастной диапазон был выбран, поскольку в этом возрасте значительно повышается риск развития глаукомы и диабета.

Образцы СЖ были отобраны у 33 больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) (45-60 лет, 22 женщины и 11 мужчин) из которых у 16 пациентов была начальная стадия ПОУГ (ПОУГ I), у 10 – развитая (ПОУГ II) и 7 – далеко зашедшая (ПОУГ III). Образцы СЖ были также получены от 21 больного диабетической ретинопатией (ДР) (45-60 лет, 13 женщин и 8 мужчин) из которых у 9 была непролиферативная ретинопатия (НПДР), у 12 - пролиферативная ретинопатия (ПДР).

Все исследования проводились с разрешения биоэтического комитета Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза». Все пациенты дали письменное информированное согласие на исследование биологического материала и использование полученных данных в научных целях. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан.

Собранные образцы СЖ помещали на лед, их обработка начиналась не позднее, чем через 2 ч после забора. Образцы подвергались центрифугированию при 20000g в течение 15 мин. Полученные супернатанты СЖ отбирали в отдельную пробирку. Аликвоту (15 мкл) супернатантов СЖ использовали для изучения методом негативного контрастирования, а осадок фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида для исследования методом ультратонких срезов.

При центрифугировании часть компонентов СЖ попадала в осадок: клетки, фрагменты разрушенных клеток и клеточный детрит в виде

скоплений пузырьков, а также нерастворимые белки. Оставшиеся белки СЖ после центрифугирования, предположительно, находятся в супернатанте во взвешенном состоянии и могут быть исследованы методом негативного контрастирования.

Для определения влияния ДР и ПОУГ на рефлекторную слезопродукцию были исследованы образцы СЖ больных на ранних стадиях заболеваний: 20 образцов СЖ больных ПОУГ I и II и 9 образцов СЖ больных НПДР, 24 образца СЖ здоровых людей были подобраны по возрасту. У выбранных образцов были измерены: объемы исходной СЖ, объемы полученных супернатантов и осадков. Объем получившегося осадка вычисляли как разницу между объемом исходной СЖ и объемом супернатанта.

### **2.3 Выделение экзосом из слезной жидкости**

Полученные низкоскоростным центрифугированием супернатанты СЖ разводили 4 мл фосфатного буфера и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Фильтрат центрифугировали при 100 000g в течение 90 мин, осадок ресуспендировали в 4 мл фосфатного буфера и вновь центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок ресуспендировали в 150 мкл фосфатного буфера, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С. Для обозначения компонентов осадков, полученных на конечной стадии выделения путем ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования, в тексте данной работы будет использован термин «образцы частиц». Аликвоты образцов частиц (15 мкл) исследовали методом негативного контрастирования и использовали для изучения РНК и ДНК.

### **2.4 Иммуноцитохимическое выявление экзосом**

Методика иммуноцитохимического выявления экзосом была отработана

на образцах экзосом культуральной жидкости и крови. За основу была взята методика, описанная в статье Zumaquero и соавт. (Zumaquero et al. 2010), с некоторыми модификациями: для выявления специфических маркеров к 10 мкл образца частиц добавляли 10 мкл 0,5 % бычьего сывороточного альбумина, вносили по 3 мкл моноклональных антител к рецепторам CD63, CD24 и CD9 (Abcam) в концентрации 100 мкг/мл или 10 мкл CD81 в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали в течение 18 ч на шейкере Eppan 358S, затем сорбировали на медные сетки, покрытые формваровой подложкой, стабилизированной углеродным напылением. Далее сетки промывали фосфатным буфером в течение 2 мин. Для выявления первичных антител к рецепторам CD63, CD24 и CD9, связавшихся с везикулами, использовали наночастицы золота (12-15 нм), конъюгированные с белком А. Для выявления CD81 использовали наночастицы золота (10-12 нм), конъюгированные с антителами кролика против IgG мыши. Сетки, на которые были сорбированы везикулы, помещали на каплю суспензии конъюгатов наночастиц золота и инкубировали 2 ч во влажной камере при комнатной температуре, затем промывали фосфатным буфером в течение 2 мин и контрастировали фосфорновольфрамовой кислотой в течение 10 сек, затем исследовали под электронным микроскопом. Конъюгат наночастиц золота с белком А был любезно предоставлен заведующим лабораторией молекулярной медицины к.б.н. Лактионовым П.П. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН), конъюгат наночастиц золота с антителами кролика против IgG мыши - к.б.н. Челобановым Б.П. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

## **2.5 Выделение экзосом из биологических жидкостей**

*Выделение экзосом из культуральной среды*

Клетки MCF-7 (рак молочной железы) культивировали в среде DMEM,

содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 6 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Культуральная среда, содержащая различные физиологически активные продукты жизнедеятельности культивируемых клеток, была собрана через 4 сут инкубации 14 млн. клеток MCF-7. Культуральные среды, собранные по завершении процесса культивирования, принято называть кондиционированными. Образцы были предоставлены к.б.н. Тамкович С.Н. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Клетки MDCK (клетки почки кокер-спаниеля) культивировали в среде IMDM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, либо с 10 % сыворотки без экзосом, полученной как описано ниже. Кондиционированная культуральная среда была собрана через 2 сут культивирования клеток с 3 чашек, в каждой из которых была разная посевная доза: высокая ( $1,5 \times 10^5$  клеток на см<sup>2</sup>), средняя ( $0,5 \times 10^5$  клеток на см<sup>2</sup>) и низкая ( $0,2 \times 10^5$  клеток на см<sup>2</sup>). Предполагается, что плотность расположения клеток при культивировании влияет на их способность к секреции экзосом. Кондиционированная культуральная жидкость для выделения экзосом была предоставлена к.б.н. Челобановым Б.П. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Выделение экзосом из кондиционированной культуральной среды проводили следующим образом: образцы центрифугировали при 800 g 10 мин (Центрифуга 5810R, Eppendorf, США) для осаждения клеток, супернатанты центрифугировали при 17 000 g 20 мин (Центрифуга 5810R, Eppendorf, США) для осаждения клеточного детрита. Полученные образцы фильтровали через фильтры с размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius, Германия) и осаждали центрифугированием при 100 000 g 90 мин (Ultracentrifuge L8-70M, ротор SW-40, Beckman, США). Осадок ресуспендировали в 12 мл фосфатного буфера и повторно центрифугировали в приведенных выше условиях. Полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл фосфатного буфера, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С.

Аликвоты исследовали методом негативного контрастирования, присутствие экзосом подтверждали методом иммуноцитохимии, используя антитела к маркерам экзосом CD63, CD24 и CD9.

Для приготовления бычьей сыворотки без экзосом её разводили в 4 раза средой DMEM, центрифугировали при 4000g в течение 10 мин (Центрифуга 5810R, Eppendorf, США) для осаждения крупных частиц, после чего центрифугировали при 100 000 g в течение 2 ч (Ультрацентрифуга L8-70M, ротор SW-40, Beckman, США) для осаждения экзосом. Супернатант отбирали из пробирок в стерильные пробирки типа Falcon (Eppendorf, Германия), оставляя небольшое (100-200 мкл) количество супернатанта на дне пробирки, чтобы не повредить осадок, содержащий экзосомы. Полученный супернатант использовали в экспериментах в качестве сыворотки без экзосом, предварительно профильтровывая его через фильтр с размером пор 220 нм для стерилизации.

#### *Выделение экзосом из крови здоровых женщин и больных раком молочной железы*

Образцы крови женщин, больных раком молочной железы, были получены из Новосибирского областного онкологического диспансера. Образцы крови здоровых женщин были получены из Центральной клинической больницы Сибирского отделения Российской академии наук.

Экзосомы из крови двух здоровых женщин и двух больных раком молочной железы для исследования были выделены к.б.н. Тамкович С.Н. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН), для чего образцы центрифугировали при 290g 20 мин (Центрифуга 5810R, Eppendorf, США) для получения плазмы, которую затем центрифугировали при 1200g 20 мин. Полученные форменные элементы крови фракционировали на лейкоциты и эритроциты. Экзосомы элюировали с поверхности клеток с помощью фосфатного буфера с добавлением 5 мМ ЭДТА или 0,25%-ного раствора трипсина (T-4799, Sigma, США). Затем из

образцов плазмы, трипсиновых элюатов с поверхности эритроцитов и лейкоцитов выделяли экзосомы по одинаковой методике: все образцы центрифугировали при 17000g 15 мин для осаждения клеточного детрита, фильтровали через фильтр с размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius, Германия) и центрифугировали при 100000g 90 мин (Ультрацентрифуга L8-70M, ротор SW-40, Beckman, США). Осадки ресуспендировали в 12 мл фосфатного буфера и снова центрифугировали при 100000g 90 мин (Ультрацентрифуга L8-70M, ротор SW-40, Beckman, США), после чего операцию повторяли. После 3-го центрифугирования супернатанты удаляли, осадки ресуспендировали в 150 мкл фосфатного буфера. Полученные образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С. Аликвоты исследовали методом негативного контрастирования, присутствие экзосом подтверждали методом иммуноцитохимии, используя антитела к CD63, CD24 и CD9.

*Выделение экзосом из мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы*

Образцы мочи здоровых мужчин и больных раком предстательной железы были получены из Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения им. академика Мешалкина Е.Н., выделенные образцы частиц для исследования были предоставлены к.б.н. Брызгуновой О.Е. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Было исследовано по 2 образца мочи здоровых мужчин и больных раком предстательной железы.

Для выделения экзосом все образцы мочи центрифугировали при 17000g 15 мин (Центрифуга 5810R, Eppendorf, США) для осаждения клеточного детрита и центрифугировали при 100000g 90 мин (Ультрацентрифуга L8-70M, ротор SW-40, Beckman, США) для осаждения экзосом. Осадки ресуспендировали в 12 мл PBS и снова центрифугировали при 100000g 90 мин (Ультрацентрифуга L8-70M, ротор SW-40, Beckman, США).

Супернатанты удаляли, осадки ресуспендировали в 150 мкл фосфатного буфера. Полученные образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С. Аликвоты исследовали методом негативного контрастирования, присутствие экзосом подтверждали иммуноцитохимическим методом, используя антитела к CD63, CD24 и CD9.

#### *Выделение экзосом из молока кобыл*

Образцы молока от трех разных кобыл были получены на ЗАО племзавод «Ирмень». Выделение экзосом начиналось в течение 6 часов после забора молока. Образцы для электронно-микроскопического исследования предоставлены к.б.н. Седых С.Е. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Выделение экзосом проводили двумя разными способами.

1. Выделение экзосом методом «последовательных центрифугирований»: образцы молока кобыл центрифугировали при 16500g 30 мин (центрифуга Avanti J-E, Beckman Coulter, США) для удаления жира, после чего дважды по 40 мин центрифугировали при 16500g для осаждения белков и клеточного детрита, супернатант фильтровали через фильтр (диаметр пор 0,22 мкм (TRP, Швейцария). Фильтрат центрифугировали при 100000g 120 мин (Ультрацентрифуга Avanti J-30I, ротор JA-30.50, Beckman Coulter, США). Осадок ресуспендировали в буфере трис-HCl (150 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl, pH 7,5) и повторно центрифугировали при 100000g 120 мин (ультрацентрифуга L8-70M, ротор, SW-60 Beckman, США). Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в буфере трис-HCl, аликвоту исследовали методом негативного контрастирования. Оставшуюся суспензию дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке Ultrogel (500 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl, pH 7,5), объемом 30 мл (скорость элюции 0,4 мл/мин, объем фракций 1,5 мл). Фракции первого пика, предположительно содержащие везикулы, диализовали против 20 mM Трис-HCl pH 7,5 в течение ночи, после чего замораживали при -70° С и подвергали лиофилизации

(Freeze Dryer, Labconco, США) в течение ночи. Лиофилизированные препараты растворяли в 60 мкл milli-Q дистиллированной воды (18МОм/см). Для дополнительной очистки образцы фильтровали через фильтр с размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius, Германия). Полученные образцы исследовали методом негативного контрастирования.

2. Выделение экзосом молока методом «последовательных центрифугирований с предварительным удалением белка»: образцы молока кобыл центрифугировали при 16500g 20 мин (центрифуга Avanti J-E, Beckman Coulter, США) для осаждения клеточного детрита. Для осаждения белков молока в полученный супернатант при постоянном перемешивании добавляли ацетат натрия до 50 мМ и титровали ледяной уксусной кислотой до pH 4,6. Раствор 20 мин центрифугировали при 16500g и титровали насыщенным раствором трис-HCl до pH 7,5, повторно центрифугировали при 16500g 20 мин (центрифуга Beckman Coulter Avanti J-E, США) и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (TRP, Швейцария). Дальнейшая обработка и исследование проводилась, как описано выше.

Присутствие экзосом в образцах, полученных разными методами из молока кобыл, подтверждали методом иммуноцитохимии, используя антитела к CD81.

## **2.6 Изучение образцов методом негативного контрастирования**

Для получения опорной пленки, необходимой для изучения образцов методом негативного контрастирования, медные сетки (Jeol, Япония) помещали на формваровую пленку, полученную из 0,35%-ного раствора формвара в дихлоэтаноле, плавающую на поверхности воды. После этого на пленку помещали полоску газетной бумаги и снимали её с поверхности воды. На поверхность формваровой пленки наносился тонкий слой углерода с помощью универсальной вакуумной напылительной установки JEE-420 (Jeol, Япония).

Для исследования суспензий, содержащих экзосомы, на каплю образца помещали медную сетку, покрытую формваровой пленкой. После инкубации излишки жидкости отбирали фильтровальной бумагой, затем образцы контрастировали 0,5%-ным водным раствором уранилацетата, или 2%-ным водным раствором фосфорновольфрамовой кислоты. Режим контрастирования каждого типа образцов подбирался экспериментально.

## **2.7 Изучение слезной жидкости методом ультратонких срезов**

Методом ультратонких срезов было исследовано 29 осадков СЖ здоровых людей, 31 осадок СЖ больных ПОУГ (16 – ПОУГ I, 9 – ПОУГ II и 6 ПОУГ III), и 18 осадков СЖ больных ДР (6 – НПДР и 12 – ПДР). Осадки СЖ, зафиксированные 4%-ным раствором параформальдегида, промывали 3 раза раствором Хэнкса и дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в течение 1 ч. Образцы затем промывали 3 раза раствором Хэнкса и проводили обезвоживание растворами этилового спирта возрастающей концентрации (30 %, 50 %, 70 % и 96 %) и ацетоном. Далее осадки на 12 ч оставляли для пропитки в смеси ацетона со смолой 1:1 при комнатной температуре. Для приготовления смолы смешивали 7,50 мл аралдита (Araldite 502), 11,25 мл смолы эпон (SPI-PON 812) и 27,75 мл смягчителя (DDSA). После пропитки осадки заливали смолой, смешанной с катализатором (DMP-30, 100 мкл на 5 мл смолы). Для полимеризации образцы помещали в термостат на 7 ч при 30 °С, на 12 ч при 42 °С и на 2 суток при 54 °С.

На ультрамикротоме (Leica, Германия) с помощью алмазного ножа (Diatome, Швейцария) готовили ультратонкие срезы, которые контрастировали насыщенным спиртовым раствором уранилацетата и 0,1%-ным водным раствором цитрата свинца.

Образцы, приготовленные методами негативного контрастирования и ультратонких срезов, изучали в просвечивающем электронном микроскопе Jem 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Снимки делали

с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (Olympus Corporation, Япония). Все измерения проводили непосредственно на экране камеры с помощью пакета программ iTEM (Olympus Corporation, Япония).

## **2.8 Терминология, использованная в данной работе для описания субмикроскопических структур**

Для описания структур, визуализированных с помощью просвечивающей электронной микроскопии, использовали следующие термины:

- «везикулы» – структуры округлой формы, имеющие ограничивающую мембрану;

- «экзосомы» (по морфологическим признакам) – везикулы размером 40-100 нм, округлой или чашеобразной формы;

- «микрочастицы» – компактные частицы, не имеющие мембраны, размером 20-40 нм;

- «клеточный детрит» – полиморфные частицы, не имеющие четкой структуры;

- «частица» - объединяет вышеперечисленные структуры, которые под электронным микроскопом выявляются как отдельная единица (одна везикула, одна микрочастица или одно компактное образование детрита);

- «образцы частиц» - компоненты осадков, полученных на конечной стадии выделения путем ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования;

- «макромолекулярные агрегаты» – структуры, состоящие из мелких одинаковых субъединиц определенной морфологии;

- «аморфное вещество» – не имеющий четкой структуры материал разной электронной плотности;

- «рыхлые глобулярные структуры» – округлые частицы с четкой границей, не имеющие мембраны.

Все использованные в работе структуры объединяются термином

"субмикроскопические структуры".

«Электронная плотность» – свойство материала пропускать или поглощать электроны, обеспечивающее различную степень «окрашенности» материала на электронограммах. Электронно-плотный материал выглядит черным или темно-серым, электронно-прозрачный – белым. При исследовании методом негативного контрастирования везикулы, целостность мембраны которых не нарушена, имеют низкую электронную плотность содержимого, так как контрастирующее вещество не проникает внутрь. Соответственно, везикулы с поврежденной мембраной имеют среднюю или высокую электронную плотность содержимого. Частицы, не имеющие ограничивающей мембраны (белковые агрегаты), могут связывать контрастирующее вещество и иметь высокую электронную плотность, либо не связывать контрастирующее вещество и иметь низкую электронную плотность.

Размер является важной характеристикой экзосом и микрочастиц, и в образцах супернатанта СЖ здоровых людей, больных ПОУГ и ДР был измерен диаметр случайно выбранных микрочастиц и везикул (770 структур, 970 структур и 620 структур соответственно). Измерения проводили не менее, чем в 6 полях зрения в 3 ячейках сетки при увеличении 60000. Таким же образом в образцах экзосом, выделенных из СЖ здоровых людей, больных ПОУГ и ДР, был измерен диаметр случайно выбранных микрочастиц и везикул (165 структур, 145 структур и 215 структур, соответственно). После этого была определена доля частиц размером 20-40 нм, 40-60 нм, 60-80 нм, 80-100 нм в супернатантах СЖ и в образцах экзосом. Обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft office Excel 2003.

Методы электронной микроскопии не позволяют проводить количественную оценку состава СЖ, поэтому для оценки структурного состава образцов СЖ мы использовали такой параметр, как доля образцов СЖ в группе, содержащих исследуемые структуры, выраженная в процентах.

Доля образцов = количество образцов, в которых присутствуют структуры / общее количество образцов в группе \* 100. Статистическая обработка данных проводилась с использованием t-критерия Стьюдента для сравнения независимых выборок. Критерий Фишера использовали при сравнении долей образцов, содержащих определенные структурные компоненты, в разных группах индивидов. Анализ данных проводился с помощью программы Statistica 8.0. Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ , на уровне тенденции – при  $p < 0,1$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Визуализация компонентов образцов частиц, выделенных из биологических жидкостей

Экзосомы обладают характеристиками, которые обуславливают интерес к активным исследованиям этих структур: (а) экзосомы несут уникальные маркеры клеток-продуцентов, а молекулярный состав экзосом изменяется в зависимости от функционального состояния клеток-продуцентов; (б) экзосомы содержат зашифрованное в белках и нуклеиновых кислотах «сообщение» для клеток-реципиентов, которое может влиять на их функционирование (Yanez-Mo et al. 2015). Эти характеристики определяют два основных направления исследований экзосом - поиск диагностических маркеров заболеваний, в частности, опухолевых и аутоиммунных (Runz et al. 2007; Dai et al. 2008; Zumaquero et al. 2010), и использование экзосом при лечении заболеваний, например, в качестве доставщиков терапевтических агентов (Sun et al. 2010; Vader et al. 2014). Успешное развитие этих исследований предполагает наличие эффективных способов выделения экзосом из биологических жидкостей. Каждая биологическая жидкость имеет характерные особенности, которые осложняют выделение экзосом и определяют необходимость разработки стандартных методов выделения экзосом. На сегодняшний день экзосомы выделены из крови (Looze et al. 2009), мочи (Prunotto et al. 2013), слюны (Lasser et al. 2011), слезной жидкости (Григорьева и др. 2016), ликвора (Chiasserini et al. 2014) и грудного молока (Pieters et al. 2015).

Все методы выделения экзосом основаны на их свойствах. Известно, что экзосомы имеют размер 40-100 нм (Cheruvanky et al. 2007), поэтому, на первый взгляд, самым эффективным способом очистки образцов является фильтрация, которая позволяет удалить из образца крупные частицы. Однако, некоторые биологические жидкости очень вязкие, это затрудняет или делает невозможной их фильтрацию. Кроме того, фильтрация помогает

удалить крупные везикулы, но не удаляет мелкие нуклеопротеидные и белковые комплексы. До сих пор ведутся споры, какие фильтры использовать для выделения экзосом, с диаметром пор 100 нм или 220 нм. Использование фильтра с размером пор 100 нм позволяет удалить больше примесей, однако, некоторые авторы утверждают, что при этом может быть потеряна часть материала, близкого по размеру к 100 нм, а экзосомы могут деформироваться (Lasser et al. 2012). В последнее время входит в практику выделение экзосом без фильтрации, с помощью центрифугирований или коммерческих наборов (Yuana et al. 2015; Felicetti et al. 2016).

Экзосомы имеют небольшой размер и массу, и осаждаются только ультрацентрифугированием (100000-110000 g) (Record et al. 2014), таким образом, ультрацентрифугирование становится необходимым шагом при выделении экзосом. Для очистки образцов от крупных частиц (клетки, клеточный детрит и крупные белковые агрегаты) и уменьшения вязкости некоторых биологических жидкостей используют последовательные низкоскоростные центрифугирования. Однако, некоторые авторы высказывают сомнения в эффективности такого метода очистки (Momen-Neravi et al. 2012). Выделение экзосом с помощью ультрацентрифугирования сопряжено с риском контаминации - некоторые макромолекулярные комплексы и слущенные пузырьки имеют характеристики, схожие с экзосомами, и также попадают в осадок (Lotvall et al. 2014).

Экзосомы имеют плавучую плотность в градиенте сахарозы 1,10-1,21 г/мл (Looze et al. 2009), что позволяет путем центрифугирования в градиенте сахарозы выделять экзосомы и отделить близкие к ним по размеру слущенные пузырьки. Однако, этот метод не получил широкого распространения (Gyorgy et al. 2011).

Трансмембранные белки семейства тетраспанинов (CD63, CD9, CD81, CD82), являются обязательным компонентом мембраны экзосом и экспонируются на их поверхности (Thery et al. 2006). Методы очистки, включающие специфическое распознавание экзосом соответствующими

антителами к этим белкам, наиболее эффективны и позволяют получить однородные образцы экзосом с минимальным риском контаминации (They et al. 2006; Vlassov et al. 2012). Разработаны коммерчески доступные наборы для выделения экзосом с помощью антител. Однако, эти методы являются весьма дорогостоящими и требуют специального оборудования, поэтому не всегда доступны.

Специальные комплекты фильтров - ExomiR (Vlassov et al. 2012) разделяют образец на несколько фракций, соответственно размеру частиц. Такой способ удобен для исследования РНК, так как РНК становится сразу доступной для анализа с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Однако, показано, что большая часть РНК циркулирует в крови не внутри экзосом, а в связи с нуклеиновыми комплексами (Wang et al. 2010), которые имеют размер близкий к экзосомам, что необходимо учитывать при анализе данных.

Многие исследователи используют метод выделения экзосом из биологических жидкостей с помощью коммерческого набора Exoquick (Andre et al. 2002; Navabi et al. 2005; Hannafon et al. 2015; Babic et al. 2016). Однако, качество выделяемых с его помощью образцов экзосом подвергается сомнению, так как образцы часто контаминированы агентом выделения (Yamashita et al. 2016).

В данной работе выделение экзосом проводилось методом последовательных центрифугирований с модификациями, учитывающими особенности каждой биологической жидкости: питательной среды для культивирования клеток, крови, мочи и молока (таблицы 3.1 и 3.2). Для обозначения компонентов осадков, полученных на конечной стадии выделения путем ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования, будет использован термин «образцы частиц». Такие образцы многими авторами называются «экзосомы» (They et al. 2006), несмотря на то, что они содержат так же структуры, не имеющие мембраны (Lotvall et al. 2014). Наличие в препаратах «неэкзосомальных» структур необходимо принимать

во внимание для корректной интерпретации полученных данных, именно поэтому изучение таких образцов требует привлечения электронной микроскопии, которая позволяет прямо визуализировать все компоненты образцов и контролировать наличие различных примесей.

**Таблица 3.1** Характеристика образцов частиц, выделенных из биологических жидкостей

Биол. жидкость	Фильтр размер пор 100 нм	Центрифугирование 100 000 g	Везикулы	Микро-частицы	Частицы детрита	Другие структуры
Среда клеток MCF-7	+	двойное	+	+	нет	нет
Среда клеток MDCK	+	двойное	+	+	+	нет
Кровь	+	тройное	+	+	+	нет
Моча	+	двойное	+	+	+	Вирусоподобные структуры, червеобразные структуры

### 3.1.1 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из кондиционированной культуральной среды

Культуры клеток широко используются при исследовании многих аспектов клеточной биологии, в том числе для изучения внеклеточных везикул. Известно, что все клетки выделяют экзосомы во внеклеточную среду. Для культур клеток внешней средой является питательная среда, в которой они культивируются (культуральная среда/ жидкость). Из культуральной среды легко получить высокоочищенные препараты экзосом, так как она содержит небольшое количество белка и не содержит жиров и других примесей, которые могут контаминировать образцы экзосом. Нами был использован метод последовательных центрифугирований с последующей фильтрацией через фильтр с диаметром пор 100 нм для выделения экзосом из кондиционированной культуральной среды клеток MCF-7 и MDCK (кондиционированная среда - среда, собранная по

завершении процесса культивирования клеток) (таблица 3.1).

Образец частиц, выделенный из культуральной среды (96 ч культивирования клеток MCF-7), содержал везикулы и микрочастицы. Везикулы имели округлую или чашеобразную форму и низкую или среднюю электронную плотность, часто располагались группами по 2-4 частицы (рис. 3.1 А). Микрочастицы представляли собой округлые агрегаты средней или низкой электронной плотности, обычно располагались поодиночке (рис. 3.1 А). В образце была измерена 121 структура, 20 % структур были микрочастицами (20-40 нм), остальные 80 % были везикулами размером 40-100 нм, которые могут быть отнесены к экзосомам. Значительная часть везикул (44 %) имела размер 40-60 нм, размер 60-80 нм имели 33 % везикул и только 3 % - 80-100 нм. Таким образом, основная доля везикул, выделяемых клетками MCF-7, имеет размер до 80 нм.

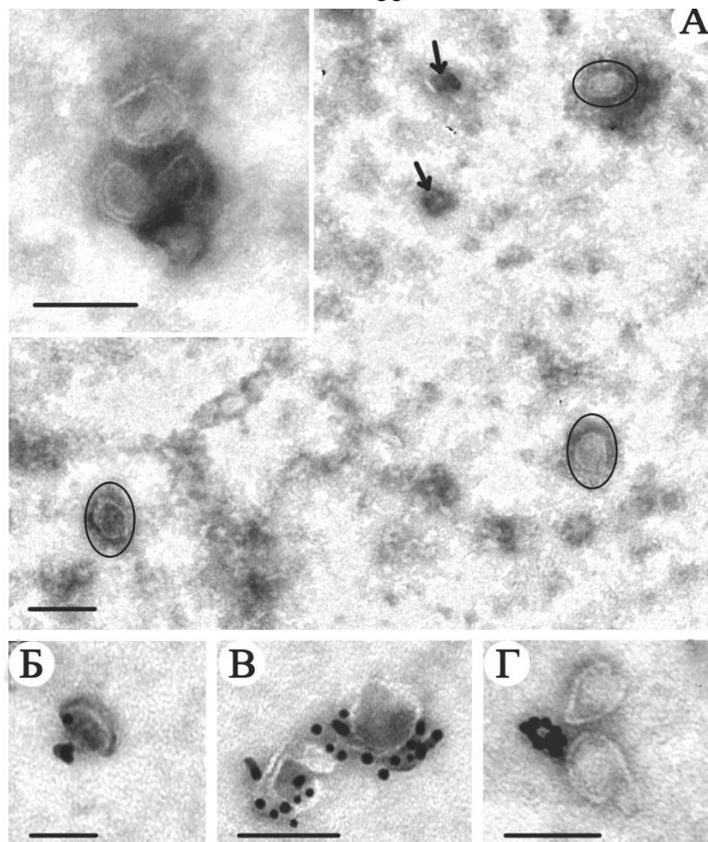
Образцы частиц клеток линии MCF-7 содержали минимальное количество примесей и имели высокую концентрацию экзосом, поэтому именно на них был отработан метод иммуноцитохимической идентификации экзосом. Были использованы антитела к белкам семейства тетраспанинов CD63 и CD9. Для подтверждения, что полученные экзосомы действительно секретируются опухолевыми клетками, были использованы антитела к белку CD24 (Runz et al. 2007; Mimeault et al. 2014). Везикулы, выделенные культуральной жидкости клеток MCF-7, связывались с антителами к CD63, CD9 и CD24, частицы золота выявлялись на их поверхности (рис. 3.1 Б-Г), - данные везикулы можно с уверенностью назвать экзосомами. Таким образом, из кондиционированной культуральной среды клеток MCF-7 выделена однородная популяция экзосом, размером 40-80 нм, несущих на поверхности специфические маркеры.

Известно, что посевная доза влияет на некоторые аспекты физиологии клеток (Vital-Reyes et al. 2006; Kim et al. 2015), существует ли такое влияние на способность культивируемых клеток секретировать экзосомы, не известно. Мы исследовали образцы экзосом, выделенные из

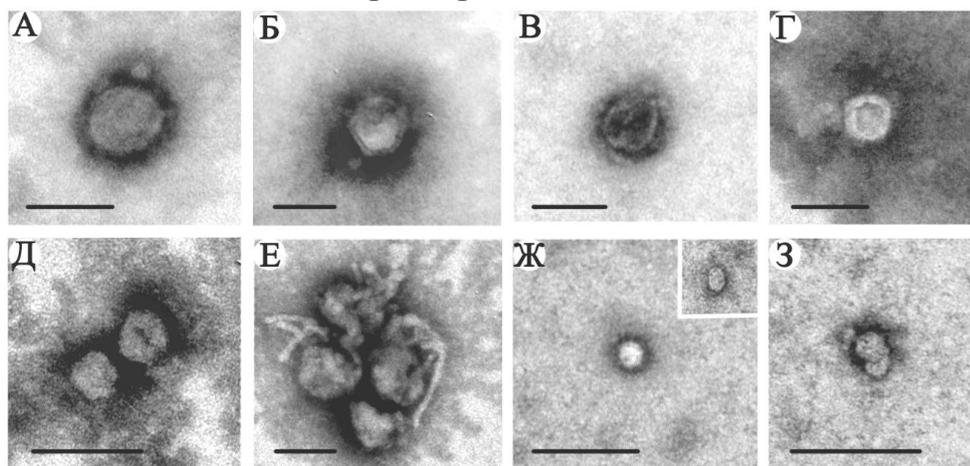
кондиционированной культуральной среды культуры клеток MDCK с высокой, средней и низкой посевной дозой. Обнаруженные в образцах везикулы (рис. 3.2 А-Г) по морфологическим признакам могли быть отнесены к экзосомам.

Образцы, выделенные из культуральной среды клеток с разной посевной дозой, отличались по количеству везикул: культуральная жидкость, собранная с клеток с низкой посевной дозой, содержала наименьшее количество экзосом. Заслуживает внимания факт, что в образцах, выделенных из культуральной среды клеток с высокой и средней посевной дозой, количество экзосом заметно не отличалось. В исследованных образцах наблюдалось большое количество микрочастиц (рис. 3.2 Ж, З) и полиморфных структур средней электронной плотности, очевидно, частиц детрита (рис. 3.2 Д, Е). Проведенное исследование не выявило заметного влияния посевной дозы клеток на количество секретируемых экзосом.

Известно, что эмбриональная бычья сыворотка, которая используется для культивирования клеток, содержит экзосомы (Shelke et al. 2014). Для того, чтобы оценить вклад экзосом бычьей сыворотки в общий пул экзосом, выделяемых из культуральной среды, клетки культивировали с обычной сывороткой и сывороткой, из которой экзосомы были предварительно удалены ультрацентрифугированием. Проведенное исследование показало, что присутствие экзосом в сыворотке при культивировании клеток MDCK, не влияет на количество везикул в образцах. Данная проблема требует дальнейших исследований: культуры клеток разных линий могут по-разному реагировать на отсутствие экзосом в сыворотке при культивировании.



**Рисунок 3.1.** Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из культуральной жидкости культуры клеток MCF-7. А – общий вид образца, овалами выделены везикулы, стрелками показаны микрочастицы, на врезке везикулы. Экзосомы, меченные антителами: Б – к CD63, В – к CD9, Г – к CD24. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование ФВК.



**Рисунок 3.2.** Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из культуральной жидкости культуры клеток MDCK. А-Г – везикулы, Д-Е – частицы детрита, Ж-З – микрочастицы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрямовой кислотой.

На сегодняшний день перед исследователями стоит проблема наработки большого количества экзосом, например, для использования их при разработке средств доставки лекарственных препаратов. Культуры клеток являются привлекательным объектом для решения данной задачи, так как позволяют получить образцы экзосом с минимальным количеством примесей. Однако, стоимость получения экзосом из культуры клеток весьма высока, так как обеспечение оборудования и растворов, используемых для культивирования клеток, требует больших затрат. Отдельной проблемой является стимуляция продукции экзосом клетками, способы которой не разработаны, более того, не показано, что стимуляция секреции экзосом не влияет на их состав.

### 3.1.2 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из крови здоровых людей и больных раком молочной железы

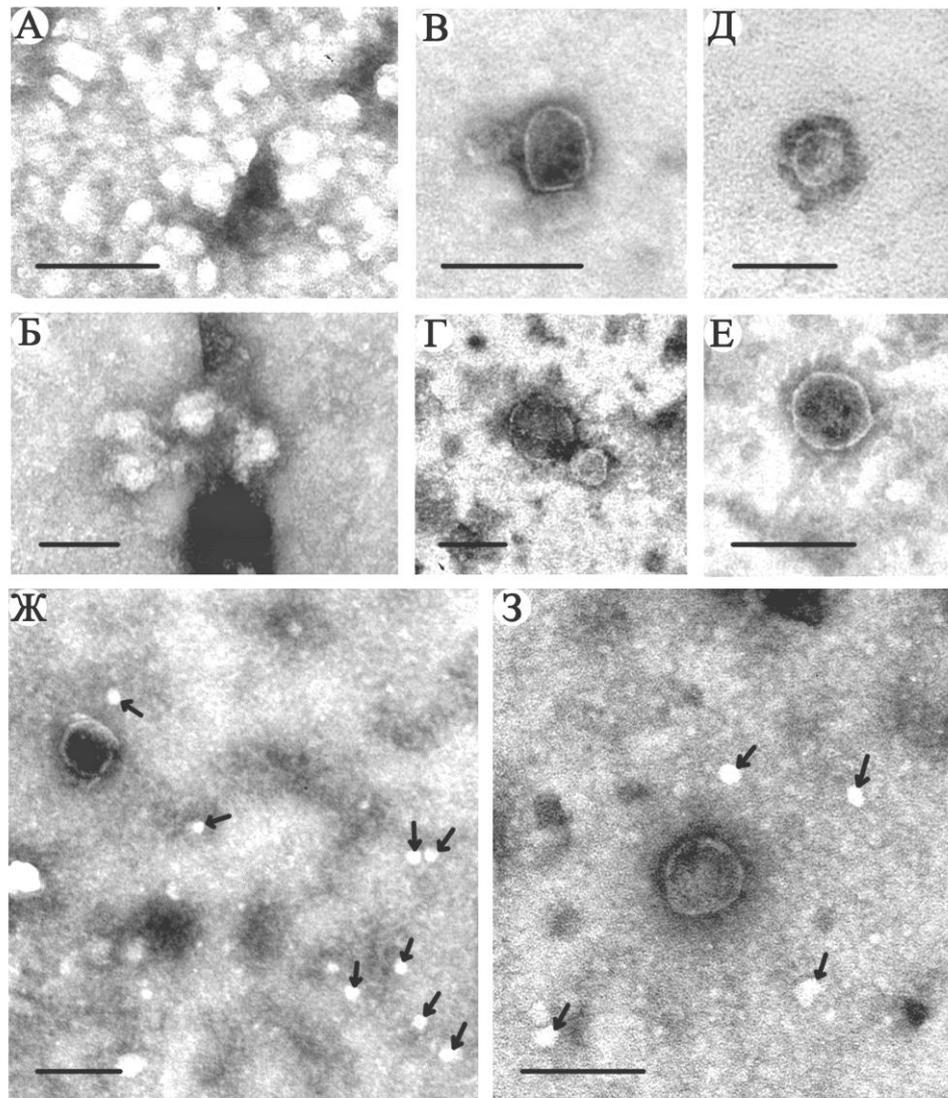
Кровь, являясь самой распространенной биологической жидкостью для поиска биологических маркеров различных заболеваний, не могла остаться без внимания исследователей экзосом. Опубликованы многочисленные работы, посвященные разработке новых малоинвазивных методов диагностики раковых заболеваний на основе анализа экзосом, выделенных из крови пациентов (Khan et al. 2012; Li et al. 2014; Nawaz et al. 2014). Однако, общепринятые методы выделения экзосом из крови имеют недостатки, поэтому в настоящее время увеличилось количество работ, посвященных усовершенствованию методов выделения экзосом из крови и их хранения (Baranyai et al. 2015; Yuana et al. 2015). В данной работе для выделения экзосом из крови использовали метод последовательных центрифугирований (таблица 3.1), который широко используется в научных исследованиях (Kahlert et al. 2014; Baranyai et al. 2015).

Известно, что в крови циркулирует множество экзосом, перенося сигналы от одних клеток к другим. Неизвестно, циркулируют ли экзосомы в крови в свободном виде, или связаны с клетками, поэтому мы исследовали образцы

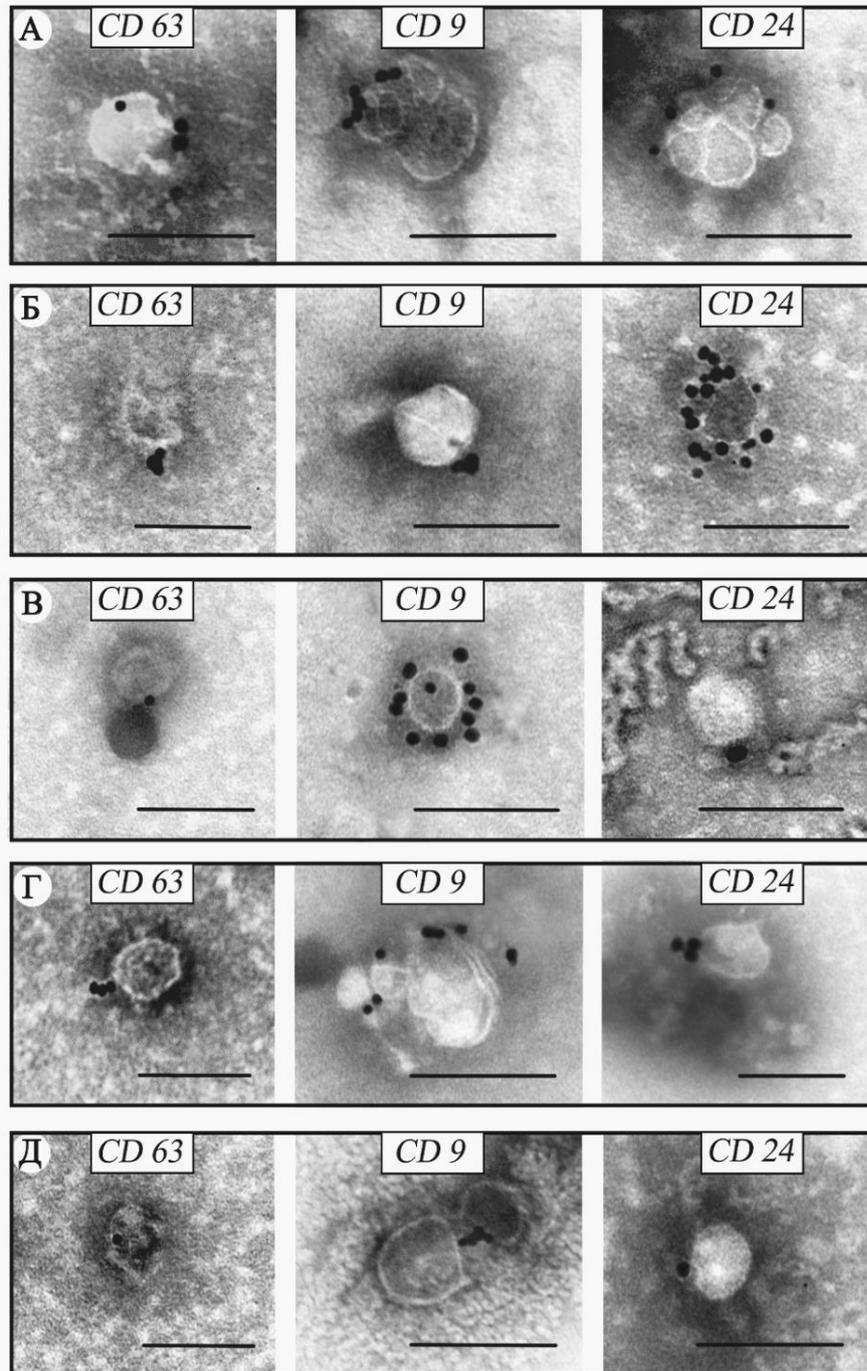
частиц, элюированных с поверхности клеток крови здоровых людей и больных раком молочной железы методом, применяемым для элюции ДНК с поверхности клеток (Тамкович и др. 2008; Bryzgunova et al. 2015).

Исследование методом негативного контрастирования показало, что все образцы частиц, как выделенные из плазмы, так и элюированные с поверхности клеток здоровых доноров и больных раком молочной железы, содержат одинаковые компоненты: везикулы, микрочастицы и частицы детрита (рис. 3.3). Единственным отличием образцов частиц, выделенных из плазмы, является присутствие агрегатов, состоящих из частиц низкой и средней электронной плотности, размером около 30 нм, контур которых плохо визуализировался, очевидно, структуры представляли собой белки плазмы (рис. 3.3 А). Везикулы в образцах имели округлую или чашеобразную форму, низкую или среднюю электронную плотность и размер 40-100 нм, таким образом, по морфологическим признакам, их можно отнести к экзосомам (рис. 3.3 Б-Г). Микрочастицы имели вид компактных агрегатов низкой или средней электронной плотности, их размер составлял 20-40 нм (рис. 3.3 Д). Частицы детрита выявлялись в виде бесформенных структур средней электронной плотности.

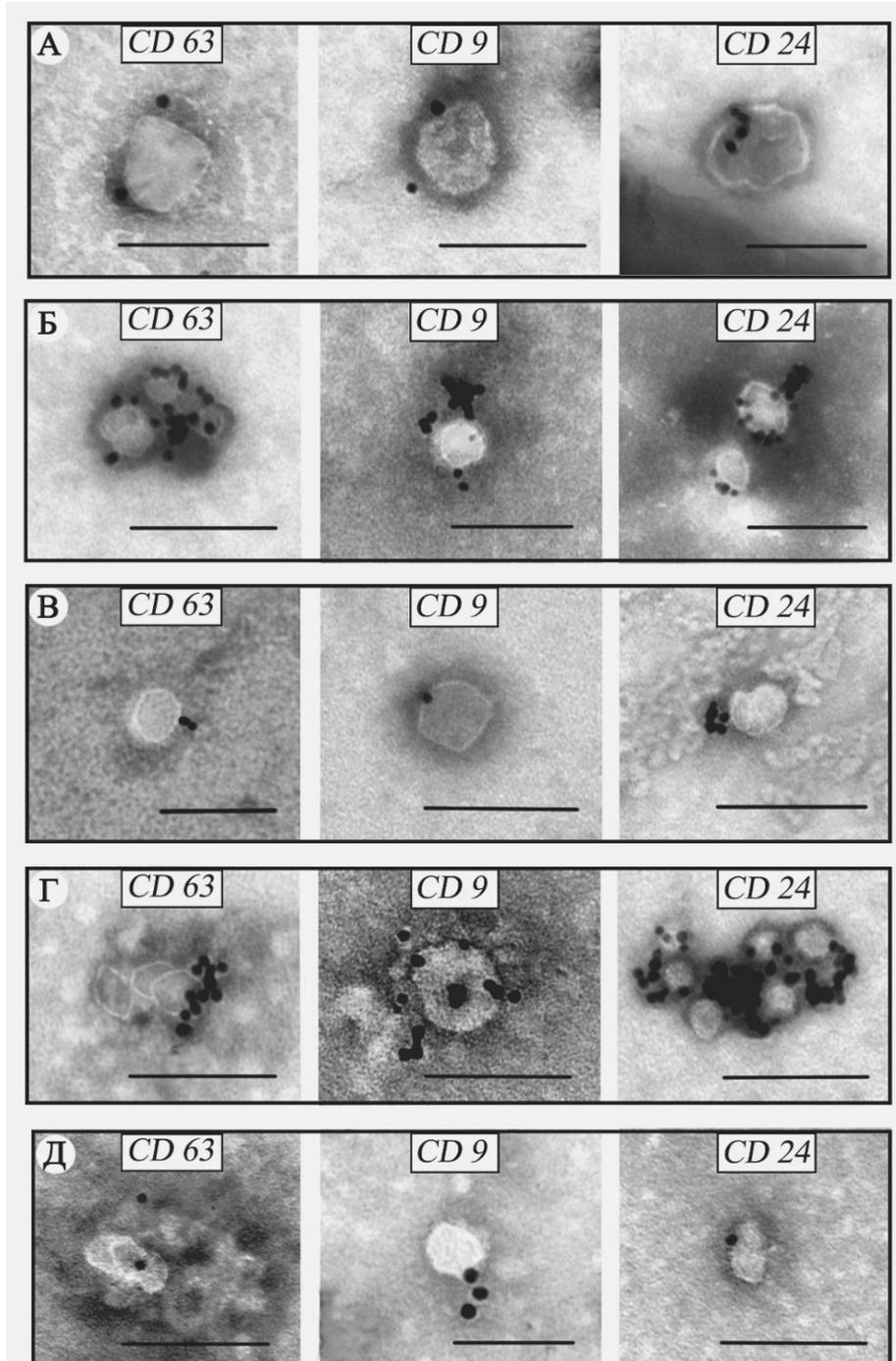
Размер является важной характеристикой везикул и может изменяться при различных заболеваниях, поэтому мы измерили везикулы и микрочастицы не менее, чем на 25-ти произвольно выбранных полях зрения при увеличении 60000. Было установлено, что образцы частиц больных раком молочной железы по содержанию частиц с размерами 20-100 нм не отличались от здоровых людей. Наибольшая концентрация везикул и микрочастиц содержалась в образцах частиц, выделенных из плазмы, при этом доля микрочастиц в образцах составляла 40 %, что может быть связано с присутствием в плазме многочисленных белков, которые образуют компактные агрегаты.



**Рисунок 3.3.** Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из крови здоровых людей и больных раком молочной железы. А – белки плазмы. Б – частицы детрита. В-Е – везикулы. Общий вид препаратов плазмы: Ж - здорового человека, З – больного раком молочной железы, стрелками показаны микрочастицы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.



**Рисунок 3.4.** Экзосомы, выделенные из крови здорового человека. А – экзосомы плазмы. Б – экзосомы, элюированные фосфатным буфером с добавлением 5 мМ ЭДТА с поверхности эритроцитов. В - экзосомы, элюированные трипсином с поверхности эритроцитов. Г – экзосомы, элюированные фосфатным буфером с добавлением 5 мМ ЭДТА с поверхности лейкоцитов. Д - экзосомы, элюированные трипсином с поверхности лейкоцитов. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, иммуноцитохимическое мечение антителами к CD63, CD9 и CD24.



**Рисунок 3.5.** Экзосомы, выделенные из крови больной раком молочной железы. А – экзосомы плазмы. Б – экзосомы, элюированные фосфатным буфером с добавлением 5 мМ ЭДТА с поверхности эритроцитов. В - экзосомы, элюированные трипсином с поверхности эритроцитов. Г – экзосомы, элюированные фосфатным буфером с добавлением 5 мМ ЭДТА с поверхности лейкоцитов. Д - экзосомы, элюированные трипсином с поверхности лейкоцитов. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, иммуноцитохимическое мечение антителами к CD63, CD9 и CD24.

Сравнение эффективности 2 способов элюции показало, что трипсин менее эффективно элюирует экзосомы с поверхности клеток, чем фосфатный буфер с добавлением ЭДТА, в последних количество везикул и микрочастиц было выше. Так же стоит отметить, что в образцах частиц, элюированных с поверхности клеток, доля везикул размером 80-100 нм была заметно выше, чем в образцах экзосом плазмы.

Для подтверждения природы экзосом был применен иммуноцитохимический метод с использованием антител к CD63, CD9 и CD24. Во всех исследованных образцах обнаружены везикулы, меченные наночастицами золота (рис. 3.4 и 3.5). Таким образом, экзосомы могут циркулировать в крови в свободном виде и выявляться в составе плазмы крови, или быть связаны с клетками крови. Механизмы взаимодействия экзосом с поверхностью клеток крови, обеспечивающие связывание, удержание и своевременное высвобождение экзосом, не выяснены и требуют дальнейших исследований.

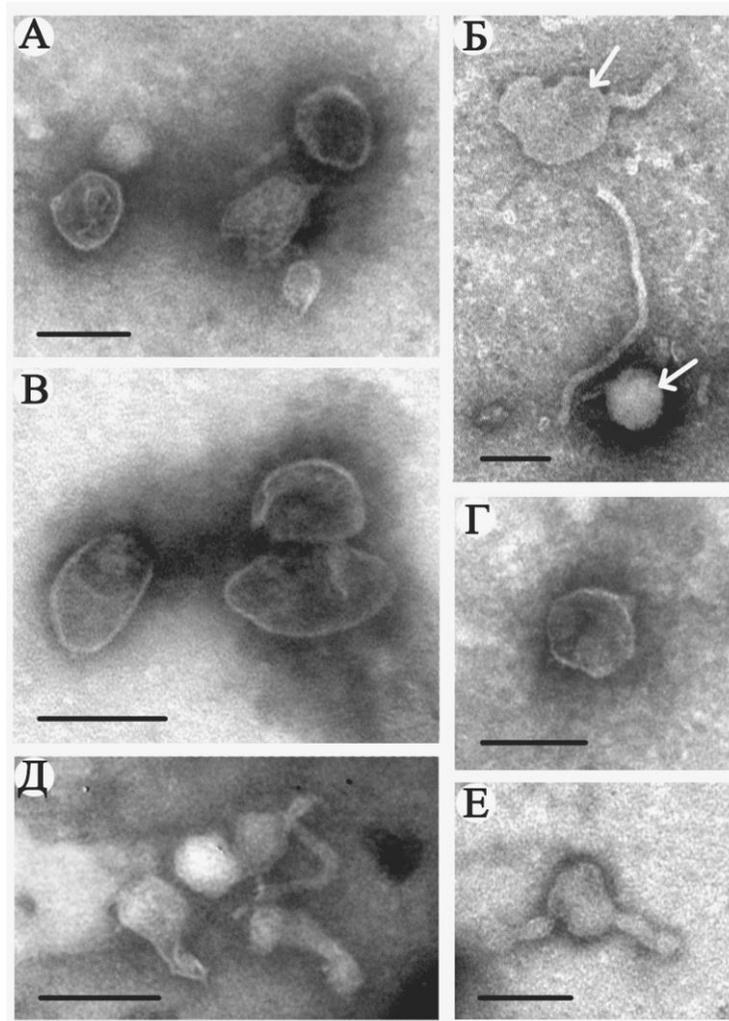
### 3.1.3 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы

Экзосомы, выделенные из мочи, могут быть хорошим источником биомаркеров заболеваний урогенитальной сферы. Биопсия тканей может «рассказать» исследователям только об одном из органов урогенитальной сферы, тогда как экзосомы и другие внеклеточные везикулы несут информацию о системе в целом (Rojo et al. 2016). В образцах экзосом мочи обнаружены маркеры многих заболеваний (Gamez-Valero et al. 2015; Yamashita et al. 2016), однако, несмотря на доступность данной биологической жидкости, в клиническую практику исследования экзосом мочи не внедрены, прежде всего потому, что на сегодняшний день отсутствуют стандартные методики подготовки образцов для выделения экзосом, а также надежные комплексные тест-системы для выявления

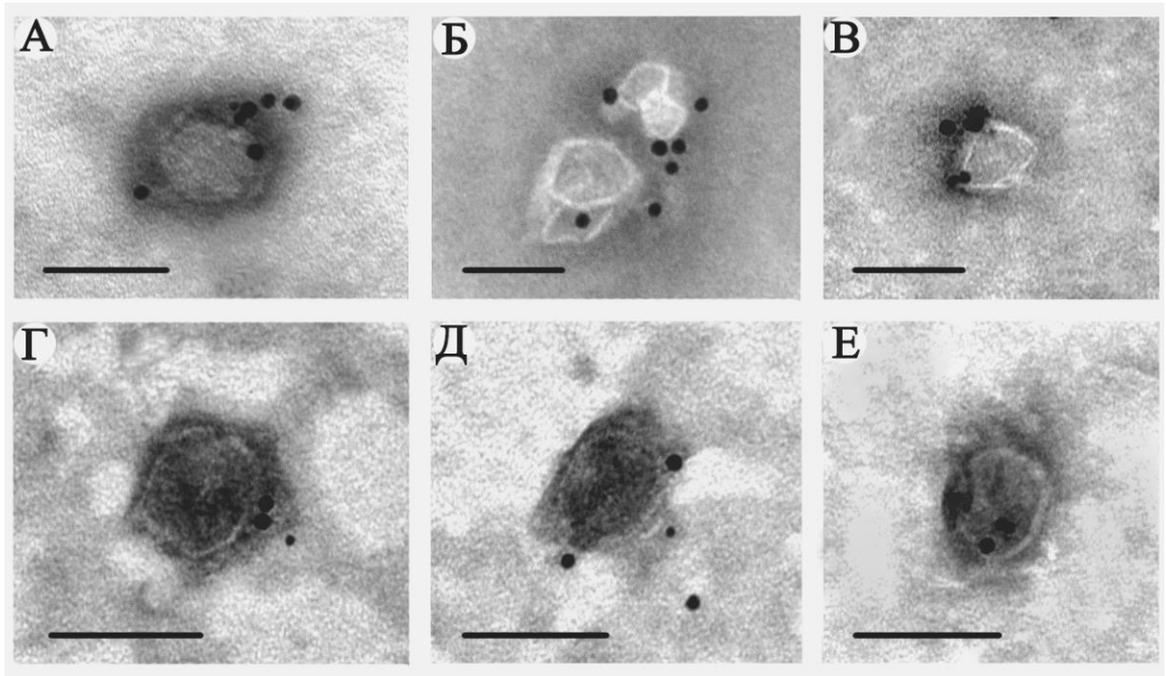
заболеваний (Rojo et al. 2016). В данной работе образцы экзосом мочи были получены методом последовательных центрифугирований (таблица 3.1).

Образы частиц, выделенных из мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы, содержали большое количество везикул (40-250 нм) округлой (рис. 3.6) или неправильной формы (овальные, вытянутые, с выступами, вдавлениями или «хвостами») (рис. 3.6 Г,Д). Большая часть везикул имела низкую или среднюю электронную плотность. В образцах частиц мочи здоровых людей везикулы преимущественно были правильной округлой формы, тогда как в образцах больных раком предстательной железы содержалось большое количество везикул неправильной формы. Такие везикулы не могут быть отнесены к экзосомам, считается, что мембрана экзосом жесткая и устойчива к деформации, так как насыщена холестерином (Record, 2012). Возможно, деформация везикул отражает нарушение их формирования в клетках больных людей. Из-за деформации многие частицы теряли округлую форму, их размер не мог быть адекватно оценен. При оценке размера везикул, имеющих форму, близкую к округлой, никаких различий между образцами мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы, выявлено не было.

Кроме везикул в образцах наблюдались частицы детрита, вирусоподобные частицы, и червеобразные структуры (рис. 3.6 Б). Частицы детрита имели неправильную форму и среднюю электронную плотность. В образцах, выделенных из мочи здоровых людей, частиц детрита было меньше, чем в образцах частиц больных раком предстательной железы. Вирусоподобные частицы обычно имели размер 60-120 нм, шестигранную форму, иногда небольшой «хвост». Червеобразные структуры низкой электронной плотности встречались как в образцах частиц, выделенных из мочи здоровых людей, так и больных раком предстательной железы, имели четкую границу, толщину 15 нм и длину 100-250 нм и не имели мембраны, часто взаимодействовали с везикулами или частицами детрита (рис. 3.6 Б).



**Рисунок 3.6.** Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из мочи здоровых людей: А – везикулы. Б – частицы детрита (показаны стрелками) и червеобразные частицы. Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из мочи больных раком предстательной железы: В – везикулы овальной формы. Г – везикула правильной округлой формы Д – везикулы, неправильной формы. Е – частица детрита. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.



**Рисунок 3.7.** Экзосомы, выделенные из мочи здорового человека, меченные антителами к рецепторам: А – CD63 , Б – CD24, В – CD9. Экзосомы, выделенные из мочи больного раком предстательной железы, меченные антителами к рецепторам: Г – CD63 , Д – CD24, Е – CD9. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрямовой кислотой.

Для подтверждения природы везикул, по морфологии соответствующих экзосомам, было проведено иммуноцитохимическое исследование с использованием антител к основным маркерам экзосом – CD63, CD9, и маркеру делящихся и дифференцирующихся клеток - CD24 (рис. 3.7). Было обнаружено, что все везикулы, выделенные из образцов мочи больных раком предстательной железы, демонстрируют положительную реакцию с антителами к рецепторам CD63, CD9 и CD24, однако, везикулы, выделенные из образцов мочи здоровых людей, демонстрировали положительную реакцию с CD24 только в половине случаев. Нужно отметить, что меченные везикулы имели округлую или овальную чашеобразную форму.

Таким образом, использованный метод позволяет выделять из образцов мочи различные структуры, часть которых можно отнести к экзосомам. Однако, присутствие в полученных образцах везикул другого происхождения затрудняет оценку образцов.

#### 3.1.4 Ультраструктура образцов частиц, выделенных из молока кобыл

Молоко – сложный секрет клеток молочной железы и является единственным источником питательных веществ для детеныша (Lonnerdal, 2003), неспособного переваривать другую пищу. Молоко содержит большое количество белков и жиров, организованных в сложные структуры, в частности, молочные жиры образуют молочные глобулы жира (milk fat globules) (Nawaz et al. 2014), оболочка которых по строению несколько напоминает мембрану липосом, а молочные белки, например, казеины, образуют мицеллы (Lonnerdal, 2003). Потребление грудного молока является критичным для развития иммунитета ребенка, так как содержащиеся в молоке экзосомы оказывают иммуномодулирующее действие, что и определяет интерес исследователей к разработке методов выделения образцов экзосом из молока человека и других млекопитающих (Raposo et al. 1996; Admyre et al. 2007). Выделение экзосом из молока представляет собой

сложную задачу, так как молоко содержит большое количество частиц, размером и морфологией сходных с экзосомами. Опубликованы работы, в которых для выделения экзосом из молока используют метод последовательных центрифугирований (Lasser et al. 2011), и даже коммерческий препарат ExoQuick (Baddela et al. 2016). В данной работе экзосомы выделяли из молока с помощью метода последовательных центрифугирований с модификацией - предварительным удалением белка с помощью изменения рН внесением в образец уксусной кислоты (таблица 3.2).

Образцы частиц, полученные из молока кобыл с помощью метода последовательных центрифугирований с предварительным удалением белка, содержали везикулы средней или высокой электронной плотности, округлой или чашеобразной формы с четкой границей без вдавлений, размер везикул составлял 40-250 нм (рис. 3.8 Б,В). Нарушение целостности мембраны везикул позволяет контрастирующему веществу (фосфорновольфрамовой кислоте) проникать внутрь везикул и придавать им высокую электронную плотность. Таким образом, большая часть обнаруженных в образцах везикул имела поврежденную мембрану.

Рыхлые глобулярные структуры (50-200 нм) округлой чашеобразной формы с четкой границей, обнаруженные в образцах частиц молока, имели низкую электронную плотность и вдавления (2-3 нм) на поверхности (рис. 3.8 А). По морфологическим признакам данные структуры во всем, кроме размера, соответствуют молочным глобулам жира (Milk fat globules), описанным в зарубежной литературе (Nawaz et al. 2014). Изменение размера структур можно объяснить фильтрацией через фильтр с размером пор 220 нм, при которой данные структуры могут дробиться на более мелкие. Рыхлые глобулярные структуры формировали скопления (до нескольких мкм), в которых отмечались редкие микрочастицы и везикулы. Микрочастицы (15-40 нм), компактные агрегаты белков, имели округлую или овальную форму, четкую границу и низкую электронную плотность (рис. 3.8 А,Б). Наличие

большого количества рыхлых глобулярных структур, образующих скопления, затрудняло визуализацию и анализ структуры везикул.

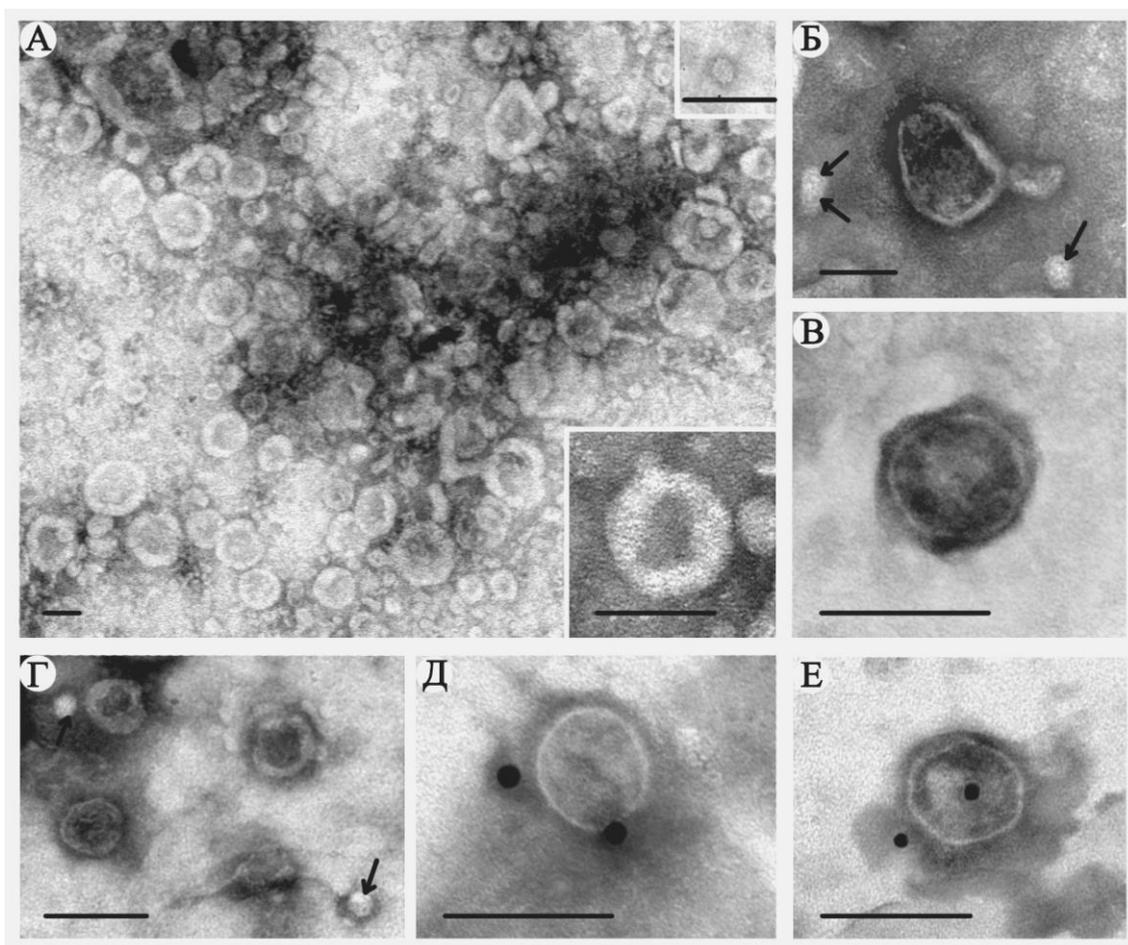
**Таблица 3.2.** Характеристика образцов частиц, выделенных из молока кобыл.

№	Фильтр размер пор 100 нм	Центри- фугирование 100 000 g	Удаление белка	Гель- фильтрация	Везикулы	Микро- частицы	Частицы детрита	Другие структуры
1	нет	двойное	нет	нет	+	+	нет	рыхлые глобулярные структуры, везикулы >100 нм
2	нет	двойное	да	нет	+	+	нет	рыхлые глобулярные структуры, везикулы >100 нм
3	нет	двойное	нет	да	+	+	нет	везикулы >100 нм
4	+	двойное	нет	да	+	+	нет	нет

Таким образом, данный метод выделения приводил к присутствию в образцах большого количества примесей и к повреждению мембраны везикул, очевидно, вследствие воздействия кислоты, используемой для удаления белка.

Для того, чтобы избежать повреждения мембраны везикул, был применен метод последовательных центрифугирований без предварительного удаления белка (таблица 3.2).

Изменение рН образцов во время выделения экзосом обеспечивало удаление большей части примесей белковой природы, однако, при изучении методом негативного контрастирования образцов, полученных с помощью метода последовательных центрифугирований с предварительным удалением белка и без удаления белка, было показано, что по количеству структур белковой природы они не отличаются и содержат одинаковые структурные компоненты.



**Рисунок 3.8.** Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из молока кобыл. А – скопление рыхлых глобулярных структур, на нижней врезке – рыхлая глобулярная структура, на верхней врезке – микрочастица (образцы выделенные методом последовательных центрифугирований). Б – крупная везикула, стрелками показаны микрочастицы, В – везикула (образцы выделены методом последовательных центрифугирований с последующей гель-фильтрацией). Г – везикулы, стрелкой показана микрочастица (образцы выделены методом последовательных центрифугирований с последующей гель-фильтрацией и ультрафильтрацией). Д-Е – экзосомы, меченные с помощью антител к рецептору CD81. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

В то же время метод выделения, не включающий понижение рН, обеспечивал сохранность мембраны везикул, основная доля обнаруженных везикул имела низкую электронную плотность. Следует подчеркнуть, что основным компонентом образцов являлись рыхлые глобулярные структуры, концентрация везикул была очень низкой, поэтому требовалось применение дополнительных методов очистки и концентрирования образцов.

Показано, что использование гель-фильтрации (size-exclusion chromatography) (Arroyo et al. 2011), позволяет получить высокоочищенные образцы экзосом (таблица 3.2). Исследование фракции первого пика методом негативного контрастирования показало, что образцы содержали большое количество везикул: часть из них имеет чашеобразную форму, низкую электронную плотность размер 40-100 нм и, соответственно, такие везикулы могут быть отнесены к экзосомам; остальные везикулы имеют размер 100-250 нм и часто представляют собой бесформенные структуры, мембрана которых образует складки. Рыхлые глобулярные структуры в образцах, очищенных с применением гель-фильтрации, отсутствовали (таблица 3.2).

Для того, чтобы избежать повреждения мембраны везикул, был применен метод последовательных центрифугирований без предварительного удаления белка (таблица 3.2).

Изменение рН образцов во время выделения экзосом обеспечивало удаление большей части примесей белковой природы, однако, при изучении методом негативного контрастирования образцов, полученных с помощью метода последовательных центрифугирований с предварительным удалением белка и без удаления белка, было показано, что по количеству структур белковой природы они не отличаются и содержат одинаковые структурные компоненты. В то же время метод выделения, не включающий понижение рН, обеспечивал сохранность мембраны везикул, основная доля обнаруженных везикул имела низкую электронную плотность. Следует подчеркнуть, что основным компонентом образцов являлись рыхлые глобулярные структуры, концентрация везикул была очень низкой, поэтому

требовалось применение дополнительных методов очистки и концентрирования образцов.

Показано, что использование гель-фильтрации (size-exclusion chromatography) (Arroyo et al. 2011), позволяет получить высокоочищенные образцы экзосом (таблица 3.2). Исследование фракции первого пика методом негативного контрастирования показало, что образцы содержали большое количество везикул: часть из них имеет чашеобразную форму, низкую электронную плотность размер 40-100 нм и, соответственно, такие везикулы могут быть отнесены к эксосомам; остальные везикулы имеют размер 100-250 нм и часто представляют собой бесформенные структуры, мембрана которых образует складки. Рыхлые глобулярные структуры в образцах, очищенных с применением гель-фильтрации, отсутствовали (таблица 3.2).

Очистка образцов от везикул размером больше 100 нм проводилась с помощью фильтрации через фильтр с размером пор 100 нм (рис. 3.8 Г) (таблица 3.2). Однако, часть везикул молока имела ригидную мембрану, что позволило им пройти через фильтр: в образцах обнаружено небольшое количество везикул, размером больше 100 нм.

Образцы, полученные методом последовательных центрифугирований, гель-фильтрации и фильтрации через фильтр с размером пор 100 нм, содержали только везикулы и небольшое количество микрочастиц (таблица 3.2). В этих образцах была определена доля везикул (40-100 нм) и микрочастиц (20-40 нм): доля последних составляла в среднем 17 %. Доля везикул 40-60 нм – 35 %, доля везикул 60-80 нм – 29 %, доля везикул 80-100 нм – 19 %. Природу экзосом подтверждали с помощью иммуноцитохимической реакции с антителами CD81: примерно треть содержащихся в образцах везикул оказалась меченной наночастицами золота (рис. 3.8 Д,Е) и может быть с уверенностью отнесена к эксосомам.

Метод выделения экзосом из образцов молока включал дополнительные стадии очистки, так как свойства молока отличаются от свойств других биологических жидкостей. В ходе исследований был подобран оптимальный

метод для выделения экзосом из молока кобыл - сочетание последовательных центрифугирований с гель-фильтрацией и фильтрацией через фильтр с размером пор 100 нм. Данный метод позволяет получать образцы с высокой концентрацией везикул (40-100 нм) и свести к минимуму количество примесей (рыхлых глобулярных структур, микрочастиц и крупных везикул). Следует подчеркнуть, что именно применение метода негативного контрастирования позволило установить, что для получения «чистых» образцов экзосом молока недостаточно последовательных центрифугирований в сочетании с фильтрацией через фильтр с размером пор 100 нм. Это еще раз подтверждает необходимость электронно-микроскопического исследования для оценки доли экзосом в образцах и контроля процедур очистки и концентрирования экзосом.

Долгое время считалось, что получаемые препараты экзосом не содержат примесей. Однако, в последующем было установлено, что разделить популяции различных везикул и других компонентов биологических жидкостей, близких по размеру, невозможно без применения комплекса специальных методов (Gould et al. 2013), которые так же не гарантируют выделения экзосом без каких-либо примесей. В связи с этим был предложен термин «внеклеточные везикулы», который обозначал образцы, содержащие все выделяющиеся из биологических жидкостей компоненты, в том числе не имеющие мембраны. Разнообразие применяемых методов и сложность очистки препаратов экзосом от микрочастиц приводят к тому, что результаты различных исследований экзосом несопоставимы между собой и практически невозпроизводимы. Отсутствие исследований состава примесей, в первую очередь, микрочастиц, еще более осложняет проблему интерпретации получаемых разными исследователями данных о составе и функциях экзосом. Созданное международное «Общество Внеклеточных Везикул» предложило приводить во всех работах детальное описание метода выделения образцов, а также тщательно исследовать свойства получаемых

препаратов внеклеточных везикул (Lotvall et al. 2014). Выполнение этих требований позволяет воспроизвести описанные эксперименты в других лабораториях и сравнить результаты разных исследований.

Тем не менее, большей частью исследователей игнорируется тот факт, что образцы, называемые "внеклеточные везикулы", помимо везикул содержат компоненты, которые не имеют ограничивающей мембраны, например, белковые комплексы и структуры, напоминающие липосомы. На данный момент существует только один метод, позволяющий оценить долю структур, не имеющих мембраны, в полученном образце - электронная микроскопия. Электронная микроскопия является эффективным методом изучения состава образцов, выделенных из биологических жидкостей, который позволяет оценивать степень контаминации образцов на всех стадиях очистки, и таким образом, установить каким именно способом могут быть удалены те или иные компоненты исходных биологических жидкостей. В данной работе методом негативного контрастирования были изучены образцы, выделенные из крови, мочи, культуральной жидкости, молока и СЖ, методом последовательных центрифугирований с различными модификациями. Анализ образцов показал, что все образцы содержат везикулы, имеющие морфологические и молекулярные признаки экзосом, однако, доля таких везикул в образцах варьирует. Оставшуюся часть образца составляют слущенные везикулы, микрочастицы, частицы детрита и макромолекулярные агрегаты. Проведенное исследование показало, что такие структуры могут составлять значительную долю образцов экзосом, что ставит под вопрос однозначность полученных данных о содержании в экзосомах тех или иных молекул. Несомненно, при изучении экзосом необходимо учитывать наличие других структур, которые выделяются совместно с экзосомами и могут влиять на результаты, полученные молекулярно-биологическими методами.

### 3.2 Характеризация компонентов слезной жидкости

Слезная жидкость (СЖ) представляет собой многокомпонентный секрет, находящийся в конъюнктивальной полости и увлажняющий наружную поверхность эпителия роговицы и конъюнктивы. СЖ постоянно обновляется за счет поступления компонентов из слезных и других желез и оттока через слезоотводящие пути; в конъюнктивальной полости находится всего 6-7 мкл СЖ (Zhou et al. 2012), которая может быть собрана с помощью капилляра. Преимуществом этого метода является высокая степень комфорта и безопасности для пациента, недостатком - слишком малое для комплексного анализа количество СЖ, особенно у пациентов с синдромом сухого глаза (Stuchell et al. 1984). Тем не менее, ряд авторов считает такой метод забора наилучшим для использования в научной работе (Wollensak et al. 1990; Zhou et al. 2012).

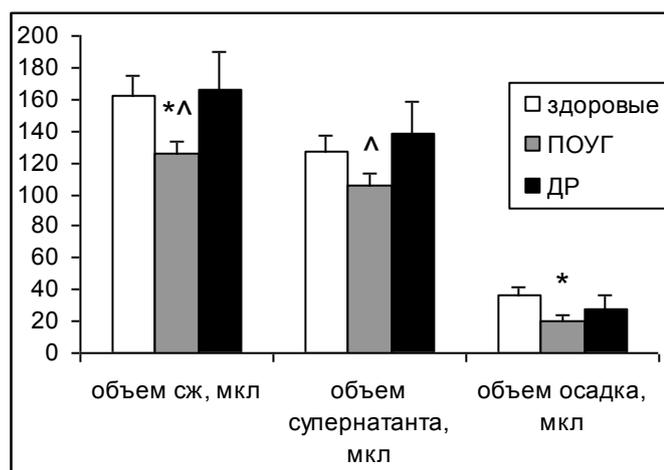
Другим распространенным методом анализа СЖ является тест Ширмера: в нижний свод глаза помещают тест-полоску, впитывающую СЖ. Тест Ширмера используется в клинике для выявления синдрома сухого глаза. К недостаткам метода относят выраженный дискомфорт для пациента, возникающий при высушивании роговицы (Stuchell et al. 1984). При использовании анестезии во время теста определяется объем только базальной слезопродукции, который невелик и не отражает состояния основной слезной железы. При раздражении роговицы скорость выделяемой рефлекторной СЖ может достигать нескольких мл в минуту (Keijser et al. 2002). В МНТК «Микрохирургия глаза» разработан метод получения СЖ при стимуляции слезоотделения порошком альбуцида, позволяющий за несколько минут получить 100-200 мкл СЖ, что вполне достаточно для исследования. Все образцы СЖ для данного исследования были получены этим методом.

*Визуальный осмотр* полученных при стимуляции альбуцидом образцов показал, что СЖ может быть прозрачной, либо содержать различные

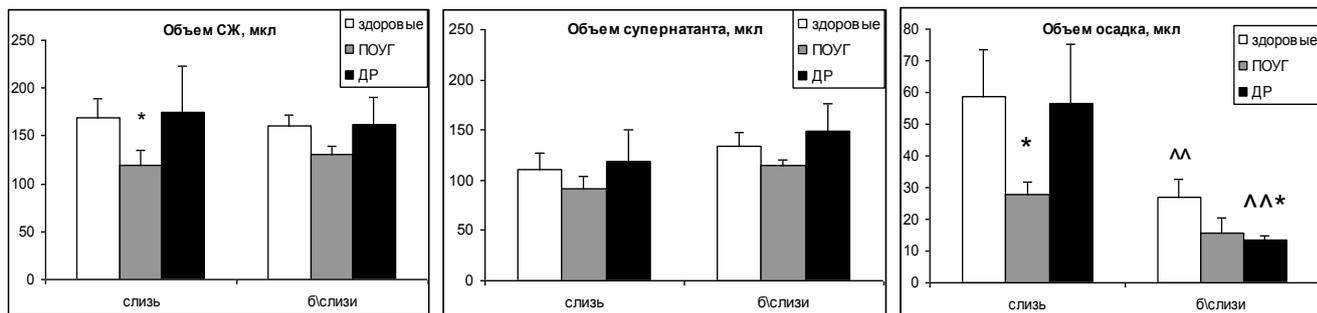
примеси, которые окрашивали ее в молочно-белый, серый или желтоватый цвет. Примеси в СЖ представляли собой темные вкрапления или гелеобразный полупрозрачный материал (очевидно, комочки слизи). При низкоскоростном центрифугировании СЖ разделяется на жидкую часть (супернатант) и твердую (осадок). Полученные супернатанты прозрачны и не содержат включений, осадки обычно белого цвета, плотные или гелеобразные рыхлые (содержащие слизь). Доля осадков СЖ, содержащих слизь, на начальных стадиях ПОУГ (31 % при ПОУГ I, и 27 % - ПОУГ II) и ДР (25 % при НПДР) достоверно не отличалась от доли осадков здоровых (29 %). На поздних стадиях заболеваний количество образцов, содержащих слизь, значительно увеличивалось, до 43 % в группе больных ПДР и до 71 % - в группе больных ПОУГ III. Очевидно, частота встречаемости слизи в образцах СЖ связана с патологическими процессами в органе зрения и является важным показателем, который необходимо учитывать в исследованиях.

*Объем выделяемой СЖ* изменяется при офтальмологических заболеваниях (Бржеский et al. 2014), поэтому у 20 больных ПОУГ I и II, 9 больных НПДР и 24 здоровых людей были определены характеристики рефлекторной слезопродукции: объем исходной СЖ, полученных супернатантов и осадков (рис. 3.9). После чего было оценено влияние наличия слизи на объем СЖ (рис. 3.10). Измерение рефлекторной и основной слезопродукции часто используется в офтальмологии для определения функционального состояния слезных желез (Actis et al. 2014; Бржеский et al. 2014). Изменение объема выделяемой СЖ и присутствие в СЖ некоторых примесей, например, слизи, может быть индикатором патологических процессов, затрагивающих и другие структуры органа зрения. Измерение объема СЖ у больных ПОУГ и ДР показало, что ДР не влияет на рефлекторную слезопродукцию, тогда как развитие ПОУГ ведет к снижению объема слезопродукции и развитию синдрома "сухого глаза". Вероятно, именно развитие синдрома "сухого глаза" приводит к появлению слизи в образцах СЖ, так как объем образцов, в

которых обнаруживалась слизь, снижался значительно.



**Рисунок 3.9.** Объем слезопродукции у здоровых людей и больных ДР и ПОУГ. Звездочкой (\*) обозначены значимые различия ( $p < 0,05$ , критерий Стьюдента) по сравнению со здоровыми, каретом (^) -  $p < 0,05$ , критерий Стьюдента при сравнении образцов слезной жидкости больных ПОУГ с больными ДР.



**Рисунок 3.10.** Объем слезопродукции в зависимости от наличия слизи. Звездочкой (\*) обозначены значимые различия ( $p < 0,05$ , критерий Стьюдента) по сравнению со здоровыми, каретом (^^ -  $p < 0,01$ , критерий Стьюдента) сравнение СЖ, содержащей слизь, и СЖ, не содержащей слизь.

В естественном физиологическом состоянии (без слезоотделения) поверхность роговицы покрыта слезной пленкой (Wolff, 1946). За секрецию компонентов слезной пленки отвечают три основных группы желез: бокаловидные клетки выделяют муцины (Cher, 2012), главные и добавочные слезные железы секретируют необходимые белки (Maitchouk et al. 2000), секрет Мейбомиевых желез образует липидную пленку (Ohashi et al. 2006).

Структура слезной пленки была подтверждена *post mortem* с помощью изучения ультратонких срезов роговицы глаза, на поверхности которой была зафиксирована слезная пленка (Nichols et al. 1983; Nichols et al. 1985). По мере развития методов исследования и накопления новых данных понятие «слезная пленка» стало заменяться понятием «зрительная поверхность», которая включает в себя роговицу, конъюнктиву, слезные железы и связанные с ними отделы век, действующие как единая система, обеспечивающая нормальное функционирование органа зрения (Cher, 2012). В этой концепции слезная пленка рассматривается как совокупность липидной пленки, водно-муцинового слоя и его аппарата прикрепления к клеткам эпителия, включающего гликокаликс, выросты и микроворсинки эпителиальных клеток, а так же белки, обеспечивающие заякоривание муцинов на поверхности эпителия (Cher, 2012). Слезная пленка - динамичная структура, которая постоянно обновляется. Изучена динамика изменений слезной пленки, в частности, её липидного слоя, при моргании (King-Smith et al. 2011), однако, вопрос, какие компоненты слезной пленки попадают в СЖ при стимуляции слезоотделения, не исследован. Предполагается, что во время слезоотделения выделяется секрет слезной железы (Бржеский и др. 2014), попадающий в собираемый образец вместе с компонентами слезной пленки. Сопоставление компонентов, образующих слезную пленку на передней поверхности органа зрения, и состава жидкости, вытекающей из конъюнктивального мешка при рефлекторной слезопродукции, не проводилось. С помощью электронного микроскопа мы исследовали образцы СЖ методом негативного контрастирования, который подходит для выявления структур (до 1 мкм), находящихся во взвешенном состоянии, и методом ультратонких срезов, позволяющим изучить более крупные нерастворимые в воде частицы осадка СЖ.

### 3.2.1 Ультраструктура осадков слезной жидкости

Считается, что доля вещества, образующего осадок при центрифугировании, в СЖ относительно невелика, и оно состоит из белков и других молекул, однако, в нем могут быть обнаружены клетки и их фрагменты, а также компоненты слезной пленки, которые не растворяются в воде. Все эти структуры могут наблюдаться при исследовании ультратонких срезов.

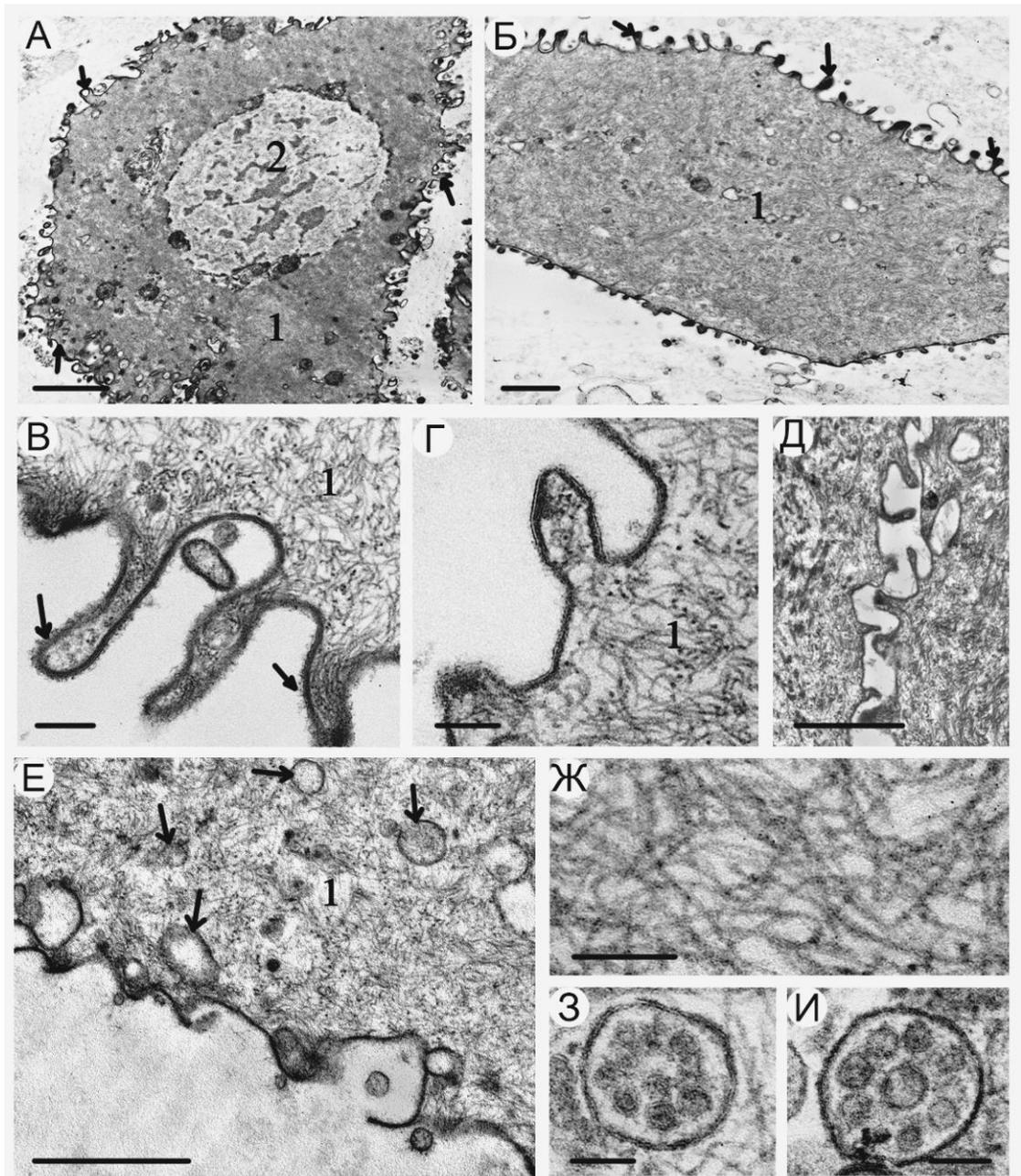
*На ультратонких срезах осадков СЖ* обнаружены эпителиоциты и лейкоциты, фрагменты клеток, разнообразные везикулы и некоторые компоненты слезной пленки, попадающие в образец при стимуляции слезоотделения.

*Клетки эпителия* роговицы и конъюнктивы постоянно обновляются и, слущиваясь с их поверхности, попадают в СЖ. На ультратонких срезах обнаружены клетки ромбовидной формы с множеством выростов (рис. 3.11 А-Г), обеспечивавших взаимодействие с другими клетками и закреплявших клетки в толще эпителиального пласта (рис. 3.11 Д). Обнаруженные в СЖ клетки не имели характерных для эпителиальных клеток плотных контактов, что указывает на их попадание в СЖ в ходе естественного слущивания. На поверхности выростов наблюдались тонкие волоконца (рис. 3.11 В), являющиеся частью гликокаликса клеток и, вероятно, обеспечивающие заякоривание муцинов путем взаимодействия трансмембранного домена с клеточным актином (Gipson, 2007). Цитоплазма клеток электронно-прозрачная, заполнена тонкими волоконцами (рис. 3.11 Ж), редкие органоиды представлены митохондриями, элементами эндосомальной системы и пузырьками (рис. 3.11 Е), отмечались единичные мультивезикулярные тельца (рис. 3.11 З,И).

Слущивание клеток при обновлении эпителия является естественным процессом, однако, его интенсивность может меняться в зависимости от некоторых факторов, например, при офтальмологических заболеваниях. Для

оценки влияния ДР и ПОУГ на процесс слущивания эпителиальных клеток, мы определяли долю образцов, содержащих эпителиальные клетки, в каждой группе обследованных (таблица 3.3). Анализ данных показал, что развитие ДР не влияло на процессы слущивания эпителиальных клеток, частота их обнаружения в образцах СЖ не отличалась от наблюдаемой у здоровых людей. Рост доли образцов СЖ, содержащих эпителиальные клетки, характерен для ранней стадии развития ПОУГ, на последующих стадиях заболевания этот показатель снижается, в образцах СЖ больных далеко зашедшей ПОУГ эпителиальные клетки не обнаружены. Патологические процессы, связанные с повреждением эпителиальных клеток роговицы у больных ПОУГ, показаны во многих исследованиях, однако, не установлено, связан ли этот эффект непосредственно с развитием ПОУГ, или с длительным приемом противоглаукомных препаратов (Noecker et al. 2004; Pozarowska et al. 2010).

*Лейкоциты* в СЖ представлены *нейтрофилами* (рис. 3.12 Б) и *лимфоцитами* (рис. 3.12 А). Нейтрофилы имели округлую форму, цитоплазма средней электронной плотности была заполнена электронно-плотными гранулами (рис. 3.12 Г), на срезах часто встречались скопления гранул вне клеток (рис. 3.12 В). Лимфоциты имели округлую форму, основную часть клетки занимало ядро, в котором преобладал гетерохроматин, в цитоплазме средней электронной плотности были расположены редкие органеллы (рис. 3.12 А). В образцах СЖ здоровых людей выявлено небольшое количество лейкоцитов, в основном нейтрофилов; в образцах СЖ больных ДР лейкоцитов было существенно больше (таблица 3.3), отмечались как нейтрофилы, так и лимфоциты. Известно, что развитие диабета ведет к изменению проницаемости кровеносных сосудов (Gerber et al. 2015), повышенная проницаемость новообразованных сосудов в динамике заболевания, вероятно, сопровождается усилением миграции лейкоцитов из их просвета.



**Рисунок 3.11.** Эпителиальные клетки в осадках СЖ здоровых людей и больных ДР и ПОУГ. А-Б - эпителиальные клетки, стрелками показаны выросты. В-Г - выросты эпителиальных клеток, стрелками показан гликокаликс. Д - интердигитации. Е - участок цитоплазмы эпителиальной клетки, стрелками показаны мембранные органеллы. 1 - цитоплазма, заполненная промежуточными филаментами. 2 - ядро. Ж - промежуточные филаменты. 3-И - мультивезикулярные тельца. Длина масштабной линии соответствует: А - 2 мкм, Б, Д, Е - 1 мкм, В-Г - 200 нм, Ж-И - 100 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.

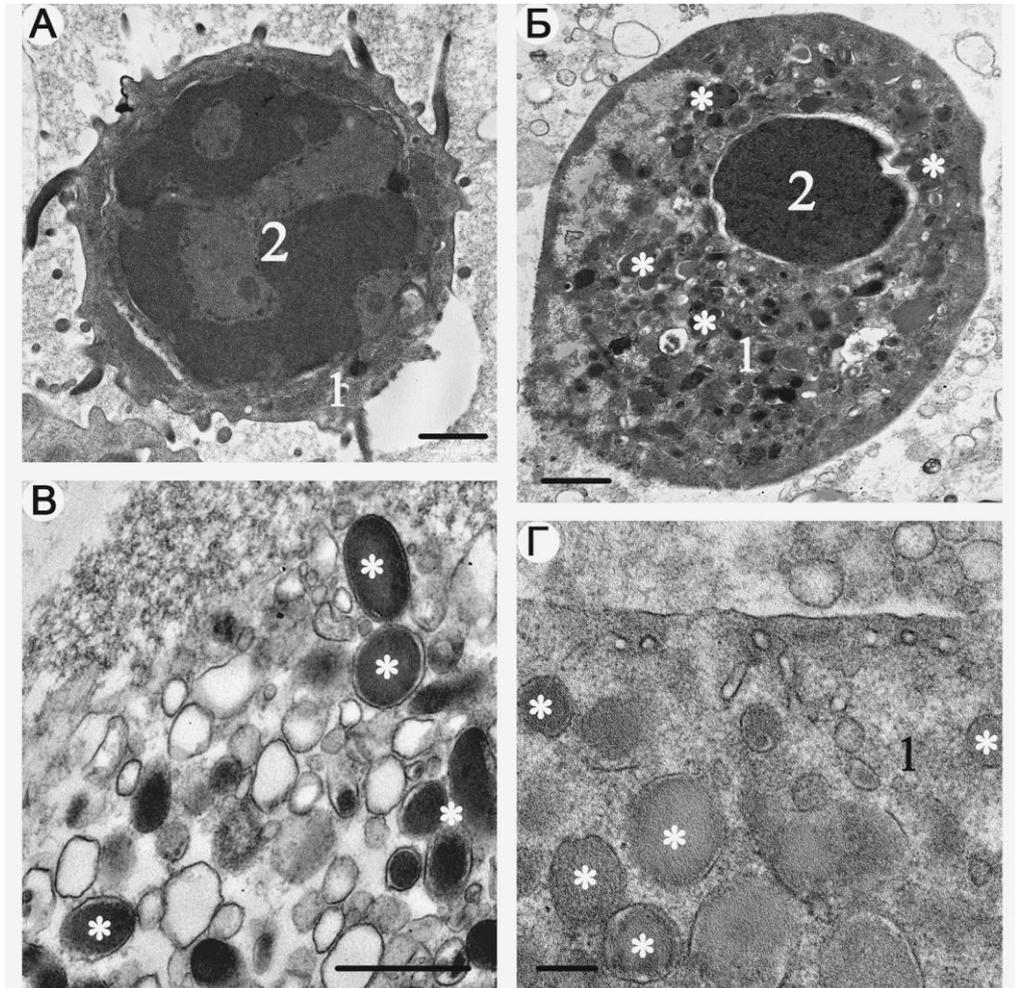
Следует отметить, что в образцах СЖ больных ПОУГ не найдено ни одного лейкоцита и их фрагментов. Можно предположить, что течение ПОУГ сопровождается нарушением проницаемости стенки терминальных венул, которое может приводить к снижению миграции лейкоцитов в ткани. Это предположение соответствует известным данным о нарушении микроциркуляции и транспорта нутриентов из крови в ткани органа зрения, которое является одним из механизмов патогенеза ПОУГ (Gerber et al. 2015).

Не все клетки, обнаруженные на ультратонких срезах, сохраняли свою целостность. Часто встречались фрагменты клеток, которые по морфологическим признакам невозможно с уверенностью отнести к тому или иному типу клеток. Многие клетки были сильно разрушены и представляли собой скопления везикул разного размера - клеточного детрита.

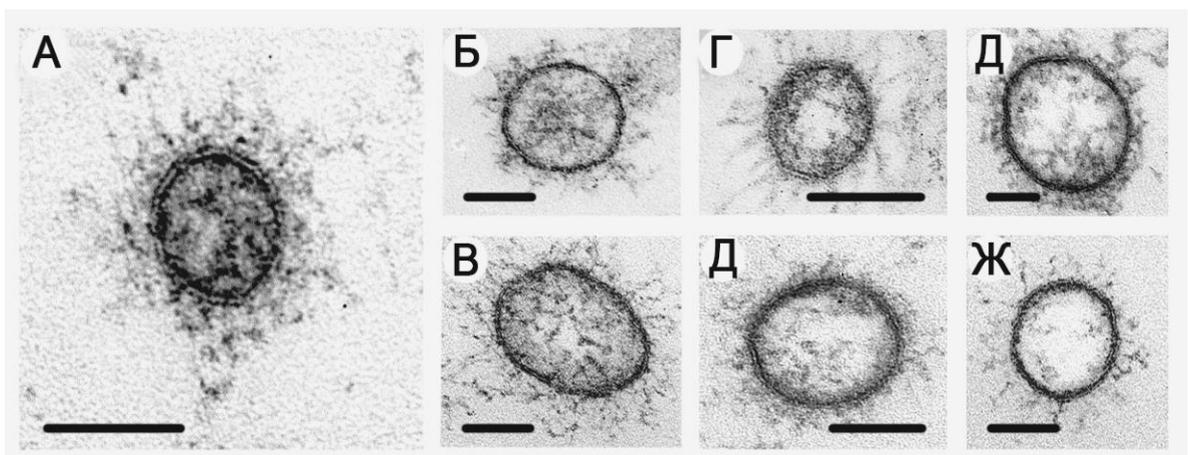
**Таблица 3.3.** Морфологические характеристики осадков СЖ (приведена доля образцов (%), содержащих определенные структурные компоненты).

Заболевание	Количество образцов	Эпителиальные клетки	Лейкоциты	Гранулы бокало-видных клеток	Липиды слезной пленки	«Мохнатые» везикулы
Здоровые	29	31 %	24 %	72 %	72 %	20 %
Непролиферативная ДР	6	33 %	33 %	83 % ^	83 %	66 % *
Пролиферативная ДР	12	41 %	66 % **	41 % *	58 %	41 %
ПОУГ I стадия	16	62 %	0 % *	62 %	81 %	62 % *
ПОУГ II стадия	9	44 %	0 %	66 %	66 %	33 %
ПОУГ III стадия	6	0 % &	0 %	83 %	66 %	33 %

ДР – диабетическая ретинопатия, ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома. Для сравнения использовался критерий Фишера: звездочкой (\*) обозначены значимые отличия по сравнению со здоровыми (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ); каретом (^) – сравнение непролиферативной и пролиферативной ДР (\* -  $p < 0,05$ ); амперсандом (&) - сравнение ПОУГ I и ПОУГ III. (\* -  $p < 0,05$ ).



**Рисунок 3.12.** Лейкоциты и их гранулы в осадках СЖ здоровых людей и больных ПОУГ и ДР. А - лимфоцит. Б - нейтрофил. В - гранулы нейтрофила в детрите. Г - гранулы нейтрофила внутри клетки. 1 - цитоплазма, 2 - ядро, звездочкой обозначены гранулы. Длина масштабной линии соответствует: А-В - 1 мкм, Г - 200 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.



**Рисунок 3.13.** "Мохнатые" везикулы в осадках СЖ: А, Г-Д – больных ПОУГ, Б-В – здоровых людей, Е-Ж – больных ДР. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.

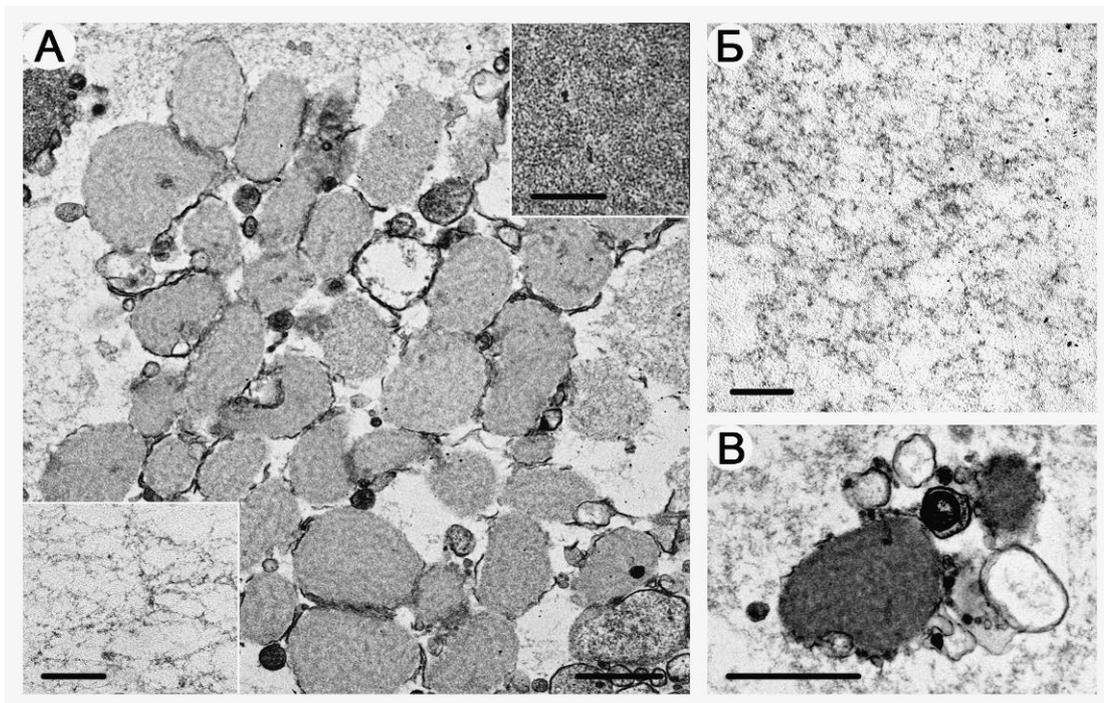
*Разнообразные везикулы*, формирующие скопления или расположенные поодиночке, выявлялись в большом количестве на ультратонких срезах осадков СЖ как здоровых людей, так и больных ДР и ПОУГ. Данные везикулы могут быть отнесены к клеточному детриту или группе внеклеточных везикул. Среди них отчетливо выделялись округлые везикулы размером 150 - 300 нм, на поверхности которых присутствовали длинные волокна, пронзающие мембрану насквозь, что указывает на наличие белкового трансмембранного домена (рис. 3.13). Наружные части волокон могли достигать в длину 150 нм, внутренние части взаимодействовали друг с другом и образовывали внутри везикулы сеть. Анализ ультратонких срезов позволил заключить, что «мохнатые» везикулы представляют собой отшнуровавшиеся участки цитоплазматических выростов и/или микроворсинок эпителиальных клеток. В работе Nichols с соавт. сходные структуры описаны как поперечные срезы микроворсинок клеток эпителия конъюнктивы, в этой же работе отмечено, что внешняя поверхность клеток конъюнктивы несет микроворсинки, тогда как эпителиальные клетки роговицы покрыты выростами (Nichols et al. 1983).

При анализе серийных ультратонких срезов не было выявлено связи «мохнатых» везикул с клетками, что свидетельствует об их отделении от поверхности эпителиальных клеток конъюнктивы и роговицы и попадании в СЖ независимо от слущивания эпителиальных клеток. В соответствии с существующими представлениями, «мохнатые» везикулы могут быть отнесены к внеклеточным везикулам (Yanez-Mo et al. 2015). В мембране «мохнатых» везикул, очевидно, заякорены муцины, связанные с трансмембранными белками (Nichols et al. 1983; Nichols et al. 1985; Gipson, 2007), морфология нитей на поверхности «мохнатых» везикул соответствует структуре волокон муцина, описанной в литературе (Danjo et al. 1998; Gipson, 2007) и наблюдаемой на ультратонких срезах СЖ (рис. 3.13). Среди больных на ранних стадиях ПОУГ и при ДР доля образцов, содержащих «мохнатые» везикулы, намного превышает таковую у здоровых людей

(таблица 3.3). Причины, по которым эпителиальные клетки формируют данные везикулы остаются не ясными, однако, увеличение их количества при патологических состояниях, по-видимому, отражает деструктивные изменения эпителиальных клеток органа зрения.

На срезах осадков СЖ обнаружены структуры, которые, очевидно, представляли собой компоненты слезной пленки, попадающие в СЖ при стимуляции. *Гранулы бокаловидных клеток* на ультратонких срезах имели размер 0,5-1,5 мкм и содержали плотно упакованный волокнистый материал, окружающая гранулу мембрана была частично или полностью разрушена, высвобожденное содержимое формировало сеть волокон (рис. 3.14).

На срезах осадков СЖ обнаружены структуры, которые, очевидно, представляли собой компоненты слезной пленки, попадающие в СЖ при стимуляции. *Гранулы муцина бокаловидных клеток* на ультратонких срезах имели размер 0,5-1,5 мкм и содержали плотно упакованный волокнистый материал, окружающая гранулу мембрана была, как правило, частично или полностью разрушена, высвобожденное содержимое образовывало на срезах сеть волокон (рис. 3.14). Исследования слезной пленки показали, что содержимое гранул бокаловидных клеток после выделения набухает, плотно упакованные волокна муцинов распределяются по поверхности роговицы, образуя трехмерную сеть (Nichols et al. 1985; Cher, 2012). Визуальная оценка площади, занимаемой сетью волокон муцинов на ультратонких срезах показала, что наибольшее их количество наблюдается в образцах больных ПОУГ на всех стадиях заболевания. Увеличение количества муцинов в СЖ больных ПОУГ, возможно, связано с длительным приемом противоглаукомных препаратов (Souchier et al. 2006; Liu et al. 2010). Количество волокон муцинов в образцах СЖ больных ДР и здоровых людей было одинаково и заметно меньше, чем в образцах больных ПОУГ. Доля образцов, содержащих гранулы бокаловидных клеток, в группе больных ПДР была заметно ниже по сравнению со здоровыми людьми и больными НПДР.



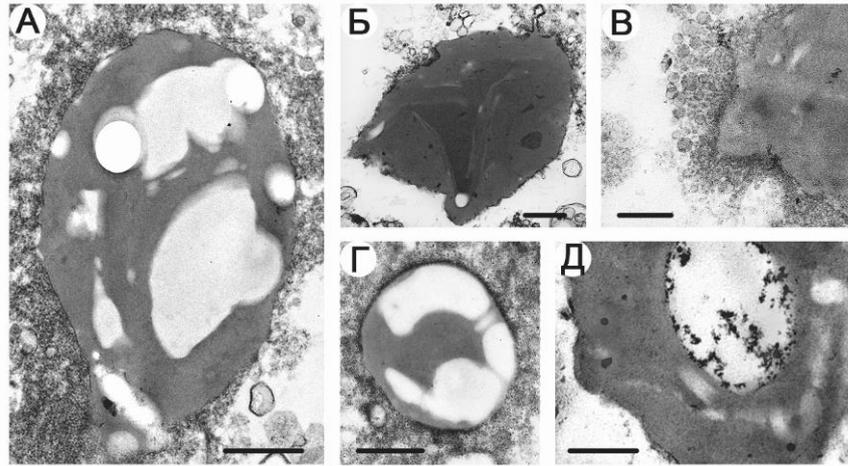
**Рисунок 3.14.** Гранулы бокаловидных клеток и сеть муцинов в осадках СЖ здоровых людей и больных ПОУГ и ДР. А - скопление гранул бокаловидных клеток, на верхней врезке волокнистый материал, выявляемый внутри гранул, на нижней - волокнистая сеть муцинов. Б - волокнистая сеть на срезах осадков больного ПОУГ III. В - гранула бокаловидной клетки в окружении волокнистой сети. Длина масштабной линии соответствует: А и В - 1 мкм, Б и врезки - 100 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.

Таким образом, у больных ПОУГ наблюдается гиперсекреция бокаловидных клеток, в то время как у больных ПДР отмечается недостаточная секреция.

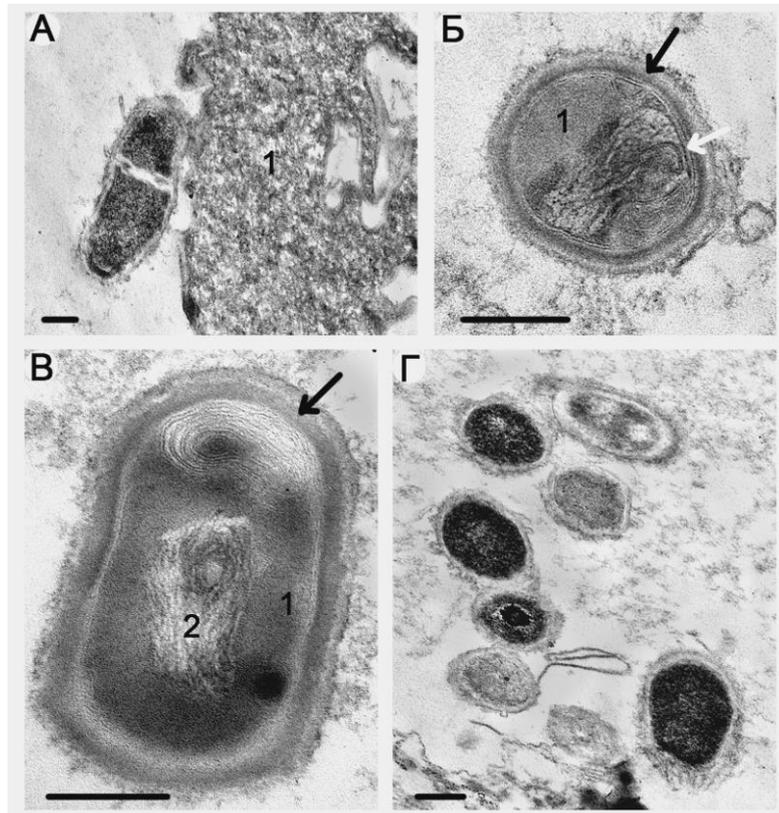
*Липидные структуры* в виде полиморфных образований, состоящих из гомогенного вещества, в котором перемежались участки средней и низкой электронной плотности (рис. 3.15), очевидно, попадали в осадки СЖ вследствие смывания слезной пленки при слезоотделении. Часто в липидных структурах присутствовали мелкие электронно-плотные включения, возможно, частицы пыли, попавшие из внешней среды (рис. 3.15). Липидные структуры в составе СЖ, очевидно, представляли собой липиды слезной пленки, которые продуцируются мейбомиевыми железами, и липиды, выделившиеся при разрушении клеток (рис. 3.15 В).

Проведенный анализ ультратонких срезов показал, что содержание липидов в образцах СЖ больных ДР и ПОУГ изменялось по сравнению со здоровыми людьми (табл. 3.3), по-видимому, отражая изменение прочности липидного слоя слезной пленки при развитии офтальмологических заболеваний. Для выявления синдрома сухого глаза оценка прочности липидной пленки проводится с помощью пробы Норна: измеряется время, за которое появляются первые разрывы липидной пленки (Бржеский и др. 2014). Однако, выявить природу «нестабильности» липидной пленки с помощью пробы Норна невозможно. Возможно, изучение ультраструктурных характеристик липидов слезной пленки может помочь в определении причины развития синдрома сухого глаза.

Внешняя поверхность органа зрения контактирует с внешней средой, в которой находится множество микроорганизмов. Для предотвращения проникновения патогенных микроорганизмов в глаз существует система защиты: (1) муцины, образующие сеть на передней поверхности органа зрения и препятствующие проникновению микроорганизмов и других инородных тел, и (2) фермент лизоцим, обладающий выраженным противомикробным действием.



**Рисунок 3.15.** Липидные структуры в осадках СЖ: А - больного ДР, Б-В - здоровых людей, Г-Д - больных ПОУГ. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.



**Рисунок 3.16.** Микроорганизмы в осадках СЖ здоровых людей и больных ПОУГ и ДР. А - грамотрицательная бактерия, связанная с эпителиальной клеткой (1). Б-В - грамположительные бактерии, 1 - цитоплазма, 2 - зона нуклеоида, черной стрелкой показана бактериальная стенка, белой - мембрана. Г - скопление бактерий. Длина масштабной линии соответствует 200 нм. Электронная микроскопия, ультратонкие срезы.

Тем не менее, некоторые микроорганизмы населяют конъюнктивальный мешок и могут быть обнаружены в СЖ. На ультратонких срезах осадков СЖ здоровых людей и больных ДР и ПОУГ отмечены разнообразные по морфологии микроорганизмы: их оболочка могла состоять из двух мембран (рис. 3.16 А, В) или одной мембраны и клеточной стенкой (рис. 3.16 Б), они могли быть покрыты слизистой капсулой или иметь гладкую поверхность (рис. 3.16). К сожалению, только по морфологии видовая принадлежность микроорганизмов определена быть не может, однако, с помощью секвенирования ДНК (Григорьева и др. 2016) в образцах СЖ здоровых людей выявлено присутствие *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* и *Pseudomonas denitrificans*, в образцах СЖ больных ПОУГ - *Lactobacillus delbrueckii*. Доля образцов, содержащих микроорганизмы, в каждой группе не превышала 10 %.

### 3.2.2 Ультраструктура супернатантов слезной жидкости

Для исследования методом негативного контрастирования обычно используют два контрастирующих вещества: уранилацетат, связывающийся с отрицательно заряженными структурами, и фосфорновольфрамную кислоту (ФВК), связывающуюся с положительно заряженными структурами в кислой среде (Wyffels, 2001). Для выявления структурных компонентов СЖ оптимальным было короткое (5 с) контрастирование образцов уранилацетатом: во всех анализируемых супернатантах были выявлены клеточный детрит, микрочастицы, везикулы (пузырьки), макромолекулярные агрегаты (ММА) (предположительно, белки или гликопротеины) и аморфное вещество (возможно, слизь) (рис. 3.16). Всегда отчетливо визуализировались ММА: уранилацетат придавал им высокую электронную плотность или не связывался с ММА, сохраняя их способность пропускать электроны, но четко очерчивая их контур. В то же время аморфное вещество не имело четкой структуры и имело среднюю электронную плотность. Все образцы супернатантов СЖ содержали примерно одинаковое количество аморфного

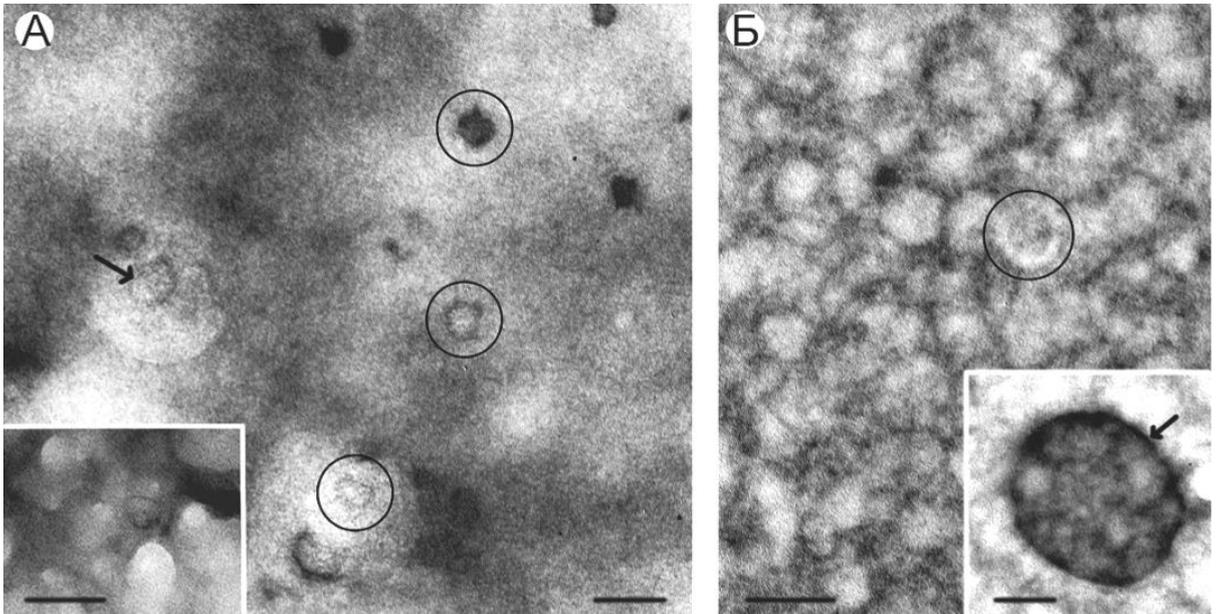
вещества, которое маскировало часть структурных компонентов. Везикулы при контрастировании уранилацетатом визуализировались наиболее четко, когда находились в окружении ММА или аморфного вещества. Выбор времени контрастирования (5 с) обусловлен тем, что при длительном контрастировании уранилацетат избыточно связывался с белковыми агрегатами и аморфным веществом, повышая их электронную плотность, что осложняло визуализацию и идентификацию остальных компонентов СЖ (рис. 3.17 А). При контрастировании ФВК было невозможно определить структуру везикул, так как вещество, выявляемое уранилацетатом как аморфное, визуализируется в виде шарообразных структур (60-80 нм), которые маскируют небольшие везикулы (рис. 3.17 Б). В связи с этим во всех дальнейших исследованиях для визуализации компонентов супернатанта СЖ использовали уранилацетат.

*Макромолекулярные агрегаты*, выявляемые в образцах супернатантов здоровых людей и больных ДР и ПОУГ, по морфологии можно разделить на три типа. Макромолекулярные агрегаты первого типа (ММА-1) четко выявлялись уранилацетатом и представляли собой разветвленные цепочки, состоящие из колечек размером около 10 нм с четкими границами (рис. 3.18 А). Макромолекулярные агрегаты второго типа (ММА-2), размером около 500 нм, состояли из округлых чашеобразных частиц (диаметром 15 и 50 нм), частично сливающихся друг с другом. Частицы при контрастировании уранилацетатом были электронно-прозрачны (рис. 3.18 Б). Макромолекулярные агрегаты третьего типа (ММА-3): рыхлые агрегаты размером 500-1000 нм, представляли собой цепочки из субъединиц диаметром около 20 нм высокой электронной плотности с нечеткими границами (рис. 3.17 В). ММА всех типов часто контактировали с везикулами, формируя «кокон» вокруг везикул (рис. 3.18 Г,Д). С помощью методов электронной микроскопии нельзя определить химическую природу обнаруженных агрегатов, очевидно, они соответствуют белкам СЖ.

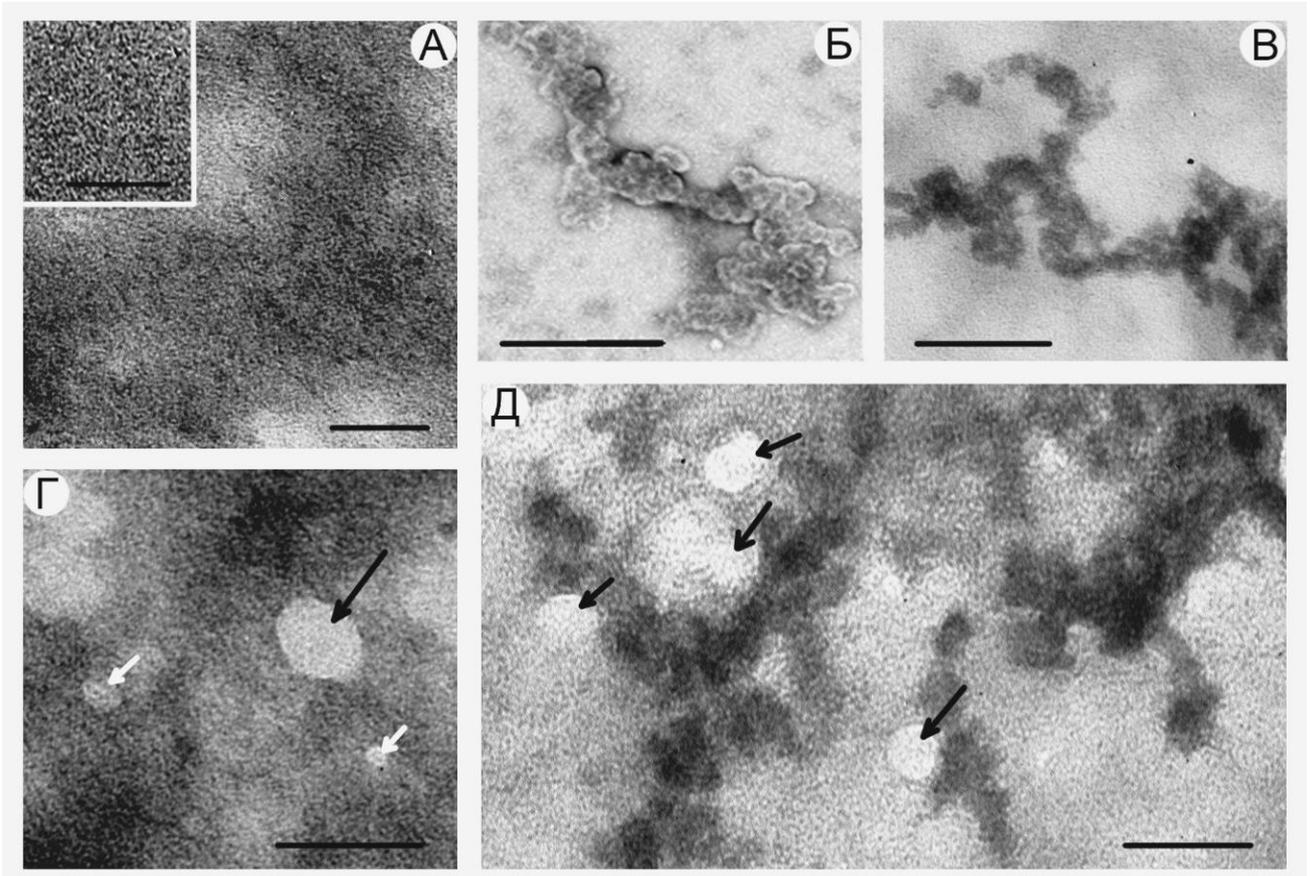
Образцы СЖ больных и здоровых людей различались по соотношению

разных типов ММА: чаще всего в образцах встречались ММА-1, реже всего - ММА-2 (таблица 3.4). ММА-1 присутствовали не менее, чем в 80 % образцов во всех исследованных группах и, очевидно, соответствуют одному из мажорных белков СЖ. ММА-2 обнаруживались лишь в 4 % образцов здоровых людей и, по-видимому, не являются обязательным компонентом СЖ. Доля образцов, содержащих ММА-2, в группах больных ДР и ПОУГ увеличивалась с развитием заболевания, в группе больных ПОУГ III ММА-2 встречались значительно чаще, чем в группе здоровых людей (таблица 3.4). Доля ММА-3 в образцах больных ПОУГ значительно изменялась в зависимости от стадии заболевания. В группе больных ПОУГ I наблюдается незначительное увеличение доли образцов, содержащих ММА-3, в группе больных ПОУГ II доля образцов возрастает почти в 2 раза, по сравнению со здоровыми, тогда как группа больных ПОУГ III не отличалась от здоровых. Интересен тот факт, что в группе больных НПДР ММА-3 не обнаружены, тогда как в группе больных ПДР ММА-3 встречались в половине образцов. По-видимому, присутствие ММА-3 в СЖ не является постоянным и зависит от многих факторов.

Таким образом, в СЖ были выявлены 3 типа ММА, которые встречались в образцах в разных пропорциях и взаимодействовали с другими компонентами СЖ, образуя с ними рыхлые скопления или плотные агрегаты. Несомненно, ММА заслуживают пристального изучения другими методами, с целью изучения белкового состава СЖ и определения роли отдельных белков в функционировании слезной пленки и поверхностных структур глаза в целом.



**Рисунок 3.17.** Общий вид образцов супернатантов СЖ больного ПОУГ III, негативное контрастирование: А - уранилацетатом, Б – фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК). Овалами выделены везикулы, стрелки показывают оболочку везикул, по-разному выявляемую контрастирующими веществами. На врезке А: общий вид препарата при длительном контрастировании уранилацетатом. На врезке Б: везикула, выявляемая ФВК. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Просвечивающая электронная микроскопия.



**Рисунок 3.18.** Макромолекулярные агрегаты в СЖ здоровых людей и больных ДР и ПОУГ. А – ММА-1, на врезке – при большем увеличении. Б – ММА-2. В – ММА-3. Г – везикулы и микрочастицы, взаимодействующие с ММА-1. Д – везикулы, взаимодействующие с ММА-3. Черными стрелками показаны везикулы, белыми – микрочастицы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование уранилацетатом.

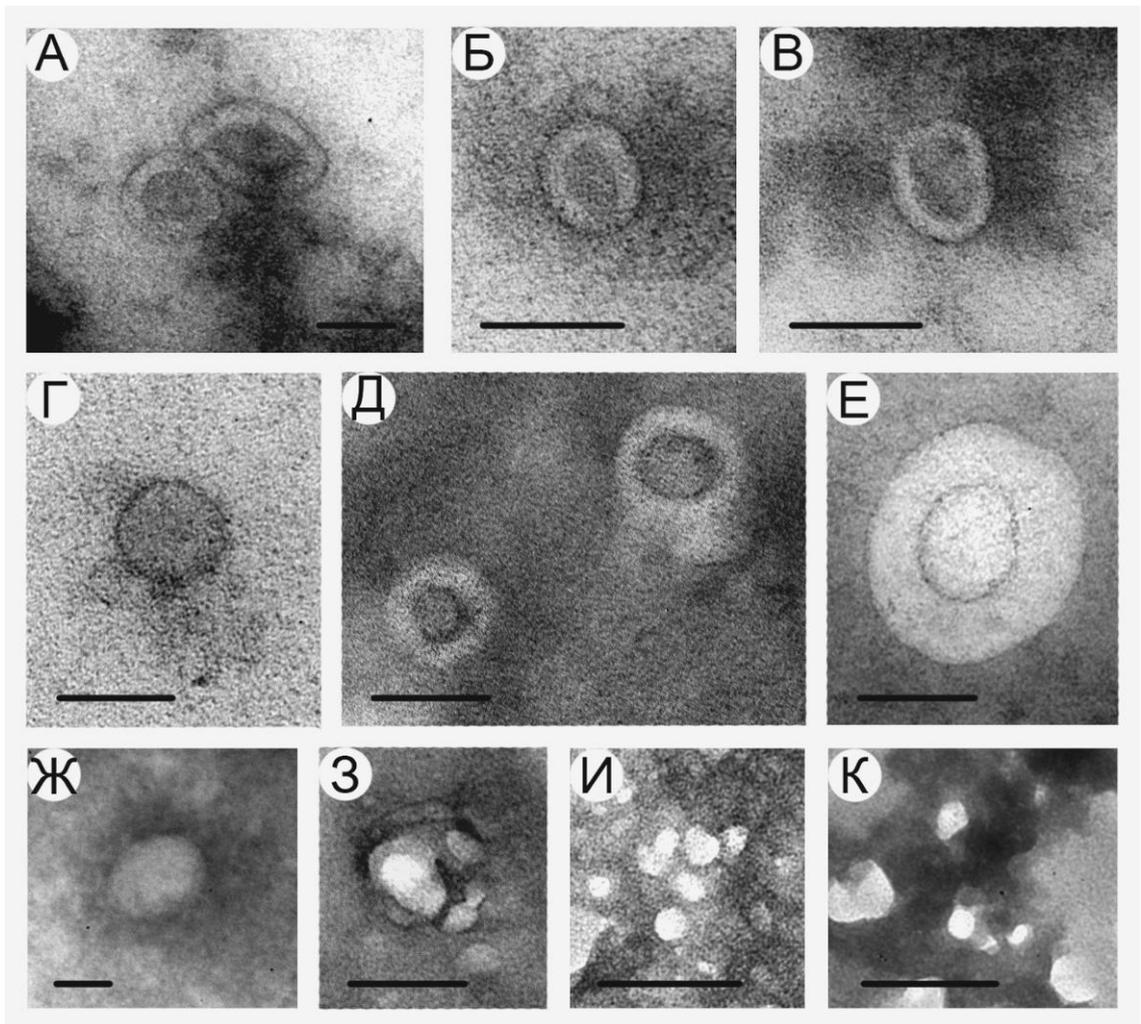
**Таблица 3.4.** Содержание макромолекулярных агрегатов ММА-1, ММА-2 и ММА-3 в образцах супернатантов СЖ (доля образцов, содержащих ММА, в каждой группе людей). Звездочкой (\*) обозначены значимые отличия (\* -  $p < 0,05$ , критерий Фишера) по сравнению с образцами СЖ здоровых людей, Каретом (^) обозначены значимые отличия (\* -  $p < 0,05$ , критерий Фишера) по сравнению со образцами с СЖ больных пролиферативной диабетической ретинопатией.

Заболевание	Число образцов	ММА-1	ММА-2	ММА-3
Здоровые	44	81 %	4 %	34 %
Непролиферативная ДР	9	100 %	11 %	0 % ^
Пролиферативная ДР	12	84 %	16 %	50 %
ПОУГ I	16	94 %	13 %	44 %
ПОУГ II	10	80 %	20 %	60 %
ПОУГ III	7	86 %	28 % *	28 %

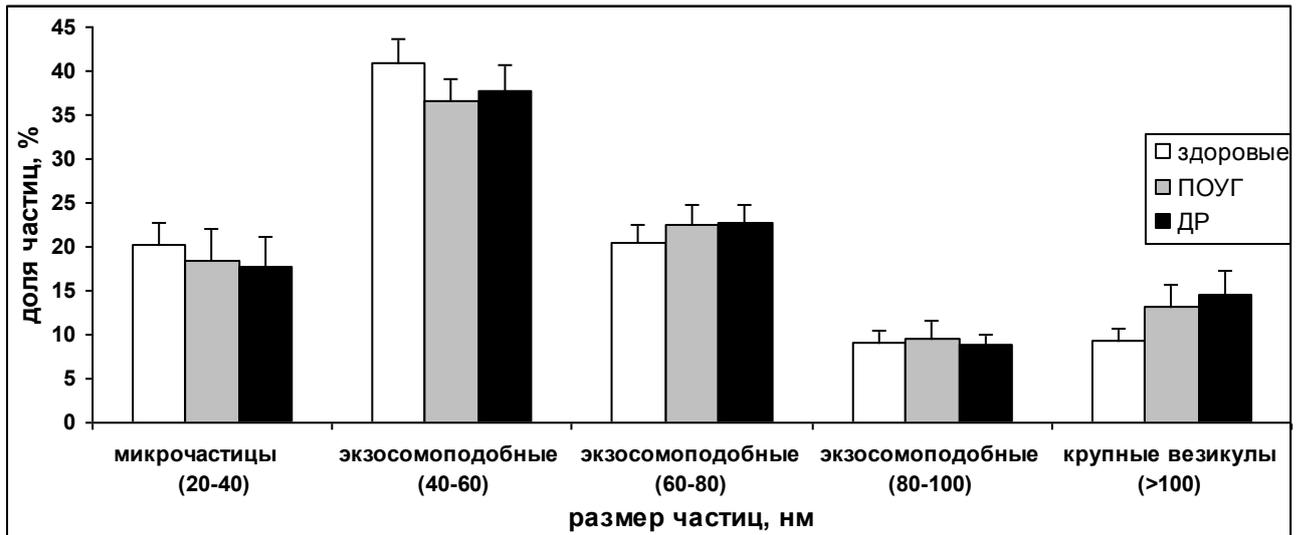
*Везикулы* – другой компонент супернатантов СЖ, при выявлении методом негативного контрастирования имеют преимущественно округлую чашеобразную форму, обусловленную сплющиванием пузырька при высушивании препарата. Везикулы, содержащиеся во всех исследованных образцах супернатантов СЖ, имели размер от 40 до 300 нм (рис. 3.19 А-Г). В образцах СЖ больных ДР везикулы отличались более тонкой мембраной, а в образцах больных ПДР и ПОУГ III везикулы были окружены «капсулой» из аморфного материала низкой электронной плотности (рис. 3.19 Д,Е). Нужно отметить, что везикулы с «капсулой», демонстрировали положительную реакцию с антителами (рис. 3.25). Содержание везикул в образцах супернатантов СЖ больных ДР и ПОУГ было выше, чем у здоровых людей,

при этом содержание везикул в образцах супернатантов СЖ больных ПОУГ сильно варьировало независимо от стадии заболевания. Часть везикул (40-100 нм, округлой чашеобразной формы) по размерно-структурным характеристикам можно отнести к экзосомам (экзосомоподобные частицы), морфология которых не отличалась от обнаруженных в образцах частиц, выделенных из СЖ. Таким образом, СЖ дает уникальную возможность сравнить морфологию компонентов интактной биологической жидкости и очищенных образцов, что невозможно сделать с другими биологическими жидкостями из-за высокого содержания в них компонентов, маскирующих везикулы (белков, гликопротеинов и др.). *Бесформенные структуры* средней электронной плотности, с однородной или зернистой структурой, по-видимому, частицы клеточного детрита (40-300 нм), присутствовали во всех образцах супернатантов СЖ (рис. 3.19 Ж), в образцах больных ПОУГ III детрит выявлялся чаще. Морфология частиц детрита в СЖ больных ПОУГ III характеризовалась полиморфизмом, наличием четкого изрезанного края, в одной частице перемежались участки высокой и низкой электронной плотности (рис. 3.19 З). *Микрочастицы*, еще один постоянный компонент супернатантов СЖ, представляют собой компактные агрегаты (20-40 нм) с четкой границей, низкой электронной плотности. Микрочастицы располагались поодиночке или в виде «виноградной грозди», часто микрочастицы выявлялись в окружении макромолекулярных агрегатов (рис. 3.19 И,К).

Результаты оценки содержания частиц в образцах супернатантов СЖ представлены на рисунке 3.20. Доля экзосомоподобных везикул (40-100 нм) практически одинакова в супернатантах СЖ здоровых и больных ПОУГ и ДР и составляет 68-70 %.



**Рисунок 3.19.** Структурные компоненты супернатантов СЖ людей: А-Г и Ж – здоровых, Д и К – больных ДР, Е, З и И – больных ПОУГ. А – крупные везикулы, Б-Г: экзосомоподобные везикулы. Д-Е – везикулы, имеющие капсулу. Ж-З - частицы детрита: И-К - микрочастицы в окружении ММА. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование уранилацетатом.



**Рисунок 3.20.** Доля частиц определенного размера в супернатантах СЖ здоровых людей и больных ПОУГ и ДР.

Морфология компонентов супернатантов СЖ, выявляемых методом негативного контрастирования (ММА, везикулы, микрочастицы и частицы детрита), изменяется при развитии ПОУГ и ДР, степень изменений возрастает на поздних стадиях заболеваний. Так, в образцах супернатантов СЖ больных ПДР и ПОУГ III нарастает содержание ММА-2, выявляются везикулы, окруженные «капсулой». Выявленные изменения морфологии и соотношения компонентов СЖ у больных ДР и ПОУГ подтверждают высокий диагностический потенциал СЖ.

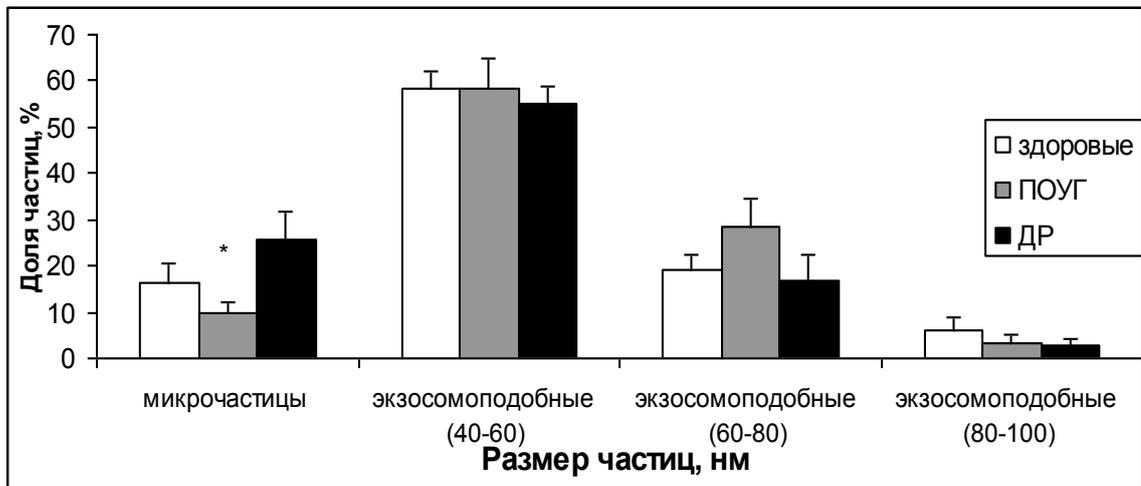
Орган зрения человека - самый важный источник информации об окружающем мире. Возрастающая нагрузка на орган зрения требует постоянного совершенствования методов лечения все новых офтальмологических заболеваний, что требует способов быстрой оценки функционального состояния "зрительной поверхности" для ранней диагностики заболеваний. Кроме того, некоторые аспекты функционирования "зрительной поверхности", в том числе слезного аппарата и слезной пленки, остаются невыясненным. Исследование слезной пленки непосредственно на передней поверхности глаза возможно только *post mortem*, однако, после смерти слезная пленка быстро деградирует. Выбор метода обеспечивающего получение образца, адекватно отражающего

компоненты слезной пленки в интактном состоянии, является актуальной задачей. Проведенное нами изучение образцов СЖ, полученных при стимуляции альбуцидом, показало присутствие в них всех компонентов слезной пленки: муцинов и липидов в осадках СЖ (твердой части), белков в супернатантах СЖ (жидкой части). Однако, остается неясным механизм, благодаря которому компоненты слезной пленки попадают в жидкость, вытекающую из угла глаза, вероятно, слезная пленка смывается с передней поверхности глаза при слезоотделении, или же наблюдаемые в образцах компоненты присутствуют в водной части СЖ вследствие естественного обновления слезной пленки. Помимо компонентов слезной пленки, СЖ содержит клетки и их фрагменты (эпителиоциты и лейкоциты), клеточный детрит и внеклеточные везикулы, среди которых особого внимания заслуживают две «особые» группы - "мохнатые" везикулы и везикулы, имеющие морфологические признаки экзосом.

### 3.2.3 Ультраструктурная характеристика образцов частиц, выделенных из слезной жидкости

Слезная жидкость и содержащиеся в ней структуры, включая экзосомы, до наших исследований не изучались, поэтому мы не можем сравнить результаты своих исследований с другими. Использованный нами метод получения экзосом широко применяется для выделения и концентрирования внеклеточных везикул и экзосом из биологических жидкостей (Lasser et al. 2011; Lasser et al. 2012) и включает в себя последовательные центрифугирования и ультрафильтрацию. Считается, что СЖ содержит небольшое количество белков и других примесей (Сомов и др. 1994), это позволяло предположить, что дополнительных модификаций данного метода не потребуется. Для обозначения осадков, полученных на конечной стадии выделения путем ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования, будет использован термин «образцы частиц», выделенные из СЖ. Анализ

полученных образцов с помощью электронной микроскопии показал, что ультрафильтрация обеспечивает полное удаление частиц крупнее 100 нм по сравнению с интактной СЖ (рис. 3.21 и 3.22).



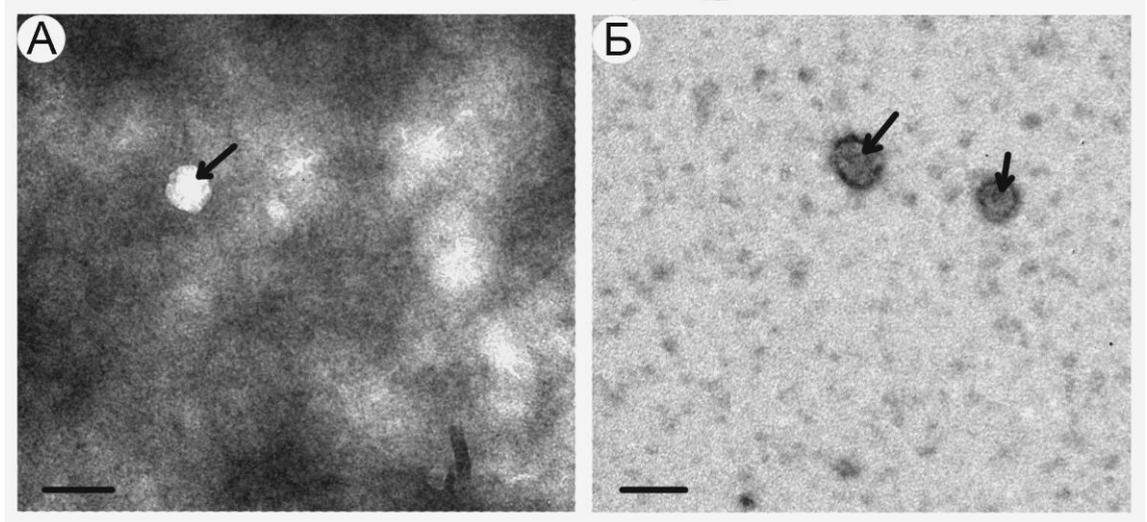
**Рисунок 3.21.** Доля везикул и микрочастиц определенного размера в образцах частиц здоровых людей и больных ПОУГ и ДР. Звездочка (\*) - различия ( $p < 0,1$ , критерий Стьюдента) при сравнении больных ПОУГ с больными ДР.

Исследованные образцы частиц СЖ здоровых людей и больных ДР и ПОУГ содержат везикулы и микрочастицы. Везикулы составляли более 70 % частиц в образцах, выделенных из СЖ и здоровых людей, и больных ДР и ПОУГ (рис. 3.21). Форма и размер везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенным из других биологических жидкостей (Admyre et al. 2007; Esser et al. 2010; De Toro et al. 2015). Везикулы имеют округлую или чашеобразную форму и низкую электронную плотность (рис. 3.23). Микрочастицы представляют собой компактные агрегаты белка (20-40 нм) низкой электронной плотности (рис. 3.23).

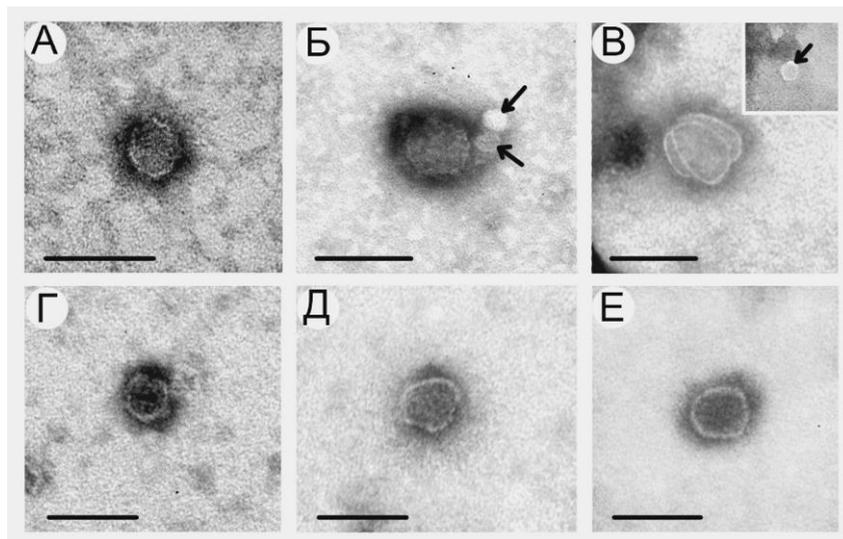
Количество везикул и микрочастиц в образцах СЖ больных ДР было выше, чем в образцах больных ПОУГ и здоровых людей, которые не различались между собой. Доля микрочастиц в образцах экзосом составляла у здоровых - 16,4 %, у больных ПОУГ – 9,6 %, у больных ДР – 25,4 % (рис. 3.21). Доля микрочастиц в образцах частиц, выделенных из СЖ здоровых людей и больных ПОУГ, снижается по сравнению с супернатантами на 20 %

и 50 % соответственно. Доля микрочастиц в образцах частиц, выделенных из СЖ больных ДР, наоборот возрастает на 40 %. Следует отметить, что подсчет микрочастиц в супернатантах затрудняется наличием ММА, поэтому для определения доли микрочастиц лучше использовать образцы частиц.

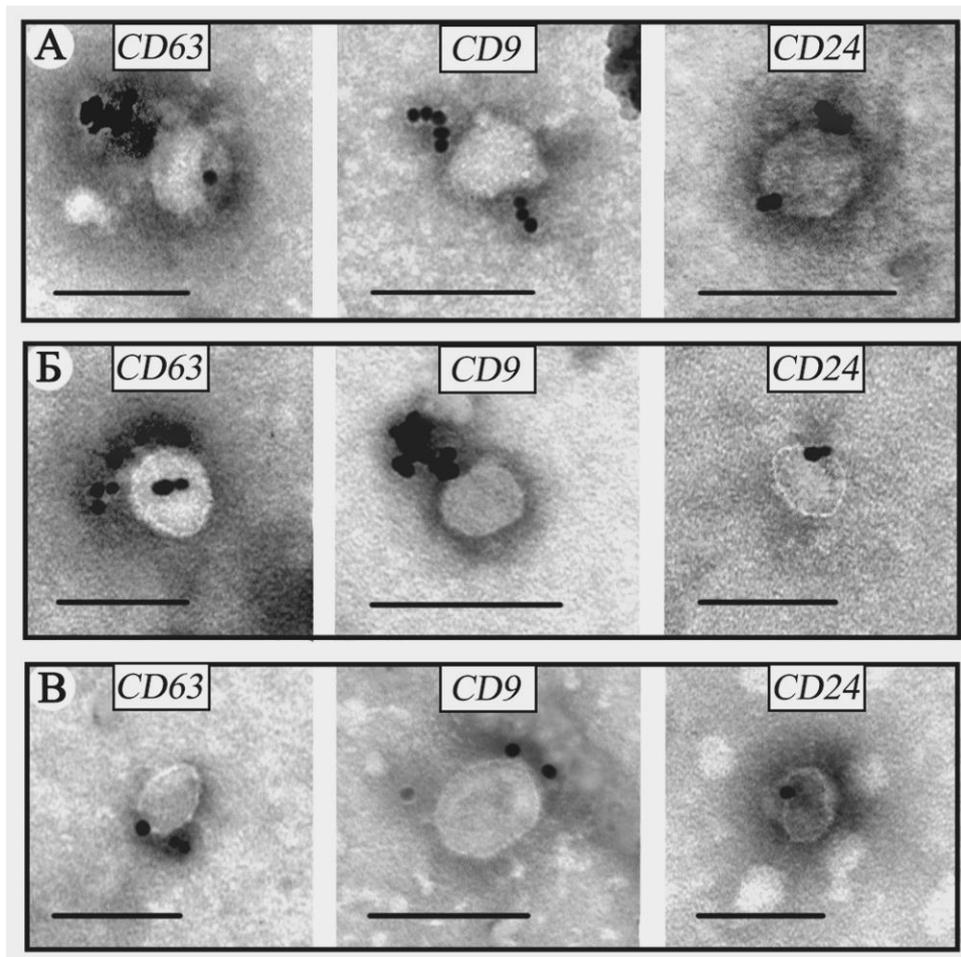
Выявление специфических маркеров с помощью меченных наночастицами золота антител – общепринятый метод идентификации экзосом (Lasser et al. 2011). Экзосомы, выделенные из СЖ здоровых людей и больных ДР и ПОУГ, связывались с антителами к CD63, CD9 и CD24, частицы золота выявлялись на их поверхности (рис. 3.24). Интересно, что более 80 % меченных экзосом имели размер 40-60 нм, остальные - 60-80 нм. Использование антител к белкам CD63 и CD9 семейства тетраспанинов, которые опосредуют адгезию экзосом на поверхности клетки-реципиента, и являются обязательным структурным компонентом мембраны экзосом (Pols et al. 2009; Lasser et al. 2011), позволяет однозначно определить природу экзосом. Наличие на поверхности экзосом белка CD24 - маркера активно делящихся и дифференцирующихся клеток, свидетельствует, что экзосомы СЖ выделяются эпителиальными клетками (King et al. 2012). Существование нескольких различных механизмов отбора макромолекул в мембране МВТ (Villarroya-Beltri et al. 2014) объясняет тот факт, что не все экзосомы в образцах связывали антитела к тетраспанинам. Нужно отметить, что белок CD24 выявлялся на поверхности практически всех экзосом СЖ здоровых людей, тогда как белок CD63 присутствовал на поверхности примерно половины экзосом, а у больных и CD63, и CD24 обнаруживались на поверхности только половины экзосом (рис. 3.25 А).



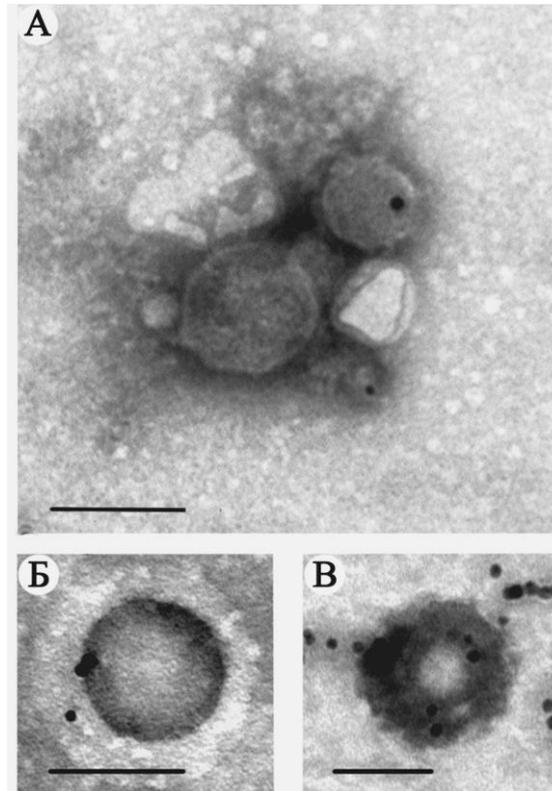
**Рисунок 3.22.** Общий вид образцов: А – супернатанта СЖ, Б – образцов СЖ после двойного ультрацентрифугирования и ультрафильтрации. Стрелками показаны везикулы. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрямовой кислотой



**Рисунок 3.23.** Структурные компоненты образцов частиц, выделенных из СЖ: А-Б – здоровых людей, В-Г – больных ПОУГ, Д-Е – больных ДР. На снимках приведены экзосомоподобные везикулы, стрелками показаны микрочастицы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрямовой кислотой.



**Рисунок 3.24.** Экзосомы, меченные с помощью моноклональных антител к рецепторам CD63, CD9 и CD24: А – выделенные из СЖ здоровых людей, Б – выделенные из СЖ больных ПОУГ, В – выделенные из СЖ больных ДР. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.



**Рисунок. 3.25.** Везикулы, меченные с помощью моноклональных антител: А – экзосома, меченная антителами к рецептору CD9 и везикулы без наночастиц золота на поверхности, выделенные из образца СЖ здорового человека; Б – везикулы, имеющие капсулу, меченные антителами к рецептору CD9, выделенные из СЖ больного ПОУГ; В – везикулы, имеющие капсулу, меченные антителами к рецептору CD24, выделенные из СЖ больного ДР. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой

Двойное ультрацентрифугирование и ультрафильтрация позволили получить из СЖ образцы, содержащие только экзосомоподобные везикулы и микрочастицы. Природа обнаруженных в СЖ внеклеточных везикул, имеющих морфологические признаки экзосом, была подтверждена с помощью методов иммуноцитохимии – все исследованные образцы содержат экзосомы. Однако, никаких ультраструктурных различий между экзосомами здоровых людей и больных ДР и ПОУГ выявлено не было. Между тем, данная работа является необходимой для дальнейшего изучения экзосом СЖ, так как визуализация и контроль «чистоты» образцов могут быть сделаны только с помощью электронной микроскопии.

Выявленные отличия структурного состава СЖ здоровых и больных ДР и ПОУГ, которые являются заболеваниями, затрагивающими глубокие структуры глаза, свидетельствуют о влиянии этих заболеваний на продукцию компонентов СЖ, состав которой, таким образом, отражает состояние глубоких структур. Морфологические признаки обнаруженных компонентов СЖ изменяются при развитии ДР и ПОУГ и степень изменений зависит от стадии заболевания. Так, на более поздних стадиях ПОУГ обнаружено увеличение доли образцов, содержащих ММА 2 типа, и уменьшение - содержащих эпителиальные клетки и «мохнатые» везикулы по сравнению с ранними стадиями. Более поздняя стадия ДР характеризовалась увеличением доли образцов, содержащих ММА 3 типа, и уменьшением – содержащих гранулы бокаловидных клеток и «мохнатые» везикулы по сравнению с ранней стадией ДР. Интересно, что сравнение ультраструктурных характеристик СЖ больных на разных стадиях заболевания со здоровыми людьми выявило, что зависимость степени изменений по-разному проявлялась у больных ДР и ПОУГ. В группе больных ДР изменения морфологии структур, выявленные по сравнению со здоровыми на ранней стадии (НПДР), усиливались к поздней стадии развития ДР (ПДР). В группе больных ПОУГ характер изменений варьировал: ультраструктурные характеристики образцов СЖ больных ПОУГ II были такими же, как у

здоровых, в то время как образцы больных ПОУГ I и III значительно отличались от здоровых по многим параметрам. В офтальмологическую практику активно внедряются разработки других отраслей науки и медицины, направленные на улучшение методов лечения и диагностики заболеваний, в частности, различные методы визуализации. Достигнуты значительные успехи в диагностике офтальмологических заболеваний, их классификации и разделении на стадии. Тем не менее, существуют нерешенные задачи, связанные с пониманием патогенеза и диагностикой заболеваний на стадиях, не имеющих клинических проявлений. Для разработки подходов к решению данных задач необходимы методы прижизненного исследования образцов тканей глаза в норме, то есть у здоровых людей. Однако, забор материала у здоровых людей невозможен, так как приводит к непосредственному нарушению целостности органа зрения, многие структуры которого не имеют механизмов полного восстановления. Соответственно офтальмология сталкивается с необходимостью поиска субстрата, который может быть собран у здоровых людей атравматично и многократно. Единственным субстратом, удовлетворяющим данным критериям, является СЖ. Исследования ее компонентов на ультраструктурном уровне является важной задачей современной фундаментальной науки, так как изменения морфологических характеристик компонентов СЖ при развитии офтальмологических заболеваний могут способствовать пониманию механизмов их патогенеза. Обнаружение и доказательство присутствия в СЖ экзосом открывает возможность поиска молекулярных маркеров, которые, вероятно, позволят выявлять заболевания на доклинических стадиях. Таким образом, проведенное исследование отвечает на вопросы фундаментальной науки, одновременно с этим, разработка метода выделения образцов экзосом из СЖ, доступных для анализа молекулярно-биологическими методами, имеет важное практическое значение, метод может быть использован в клинической практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Слезная жидкость, организованная на поверхности роговицы в слезную пленку (Cher, 2012), служит естественной защитной системой, обеспечивающей нормальное функционирование органа зрения и, таким образом, является необходимой для комфортной жизни любого человека. Слезотечение – активное выделение слезной жидкости из слезной железы, происходит в ответ на раздражение роговицы (попадание инородного тела, химических веществ) и служит для удаления раздражающего вещества. Нарушения процессов слезотечения могут привести к повреждению роговицы или развитию воспаления. Оценка некоторых физических свойств слезной жидкости (СЖ) применяется в клинической практике для диагностики заболеваний, связанных с поверхностью глаза (Бржеский и др. 2014). Очевидно, что диагностический потенциал СЖ не ограничивается данными заболеваниями, однако, до сих пор СЖ не используется в диагностических исследованиях других заболеваний органа зрения. Между тем, СЖ имеет сложный состав, который изменяется под действием разных факторов. Кроме секрета слезных желез, в состав СЖ входят продукты жизнедеятельности эпителия роговицы, конъюнктивы и век, а также сосудов конъюнктивы, из которых в СЖ могут попадать различные компоненты, содержащиеся в крови. Очевидно, что только применение методов электронной микроскопии, позволяющих визуализировать и клетки, и мельчайшие частицы, может установить состав и морфологические характеристики компонентов СЖ и оценить целесообразность исследований СЖ другими методами.

Целью данной работы было исследовать СЖ людей, как возможный источник информации для оценки состояния структур глаза, для чего, в первую очередь, было необходимо установить состав микроскопически идентифицируемых компонентов в СЖ здоровых людей. Оказалось, что СЖ, собранная при стимуляции слезоотделения альбуцидом, содержит клетки и

их фрагменты (эпителиоциты и лейкоциты, клеточный детрит), компоненты слезной пленки (муцины и липиды), особые "мохнатые" везикулы, белки в виде макромолекулярных агрегатов, внеклеточные везикулы, в том числе, - экзосомы, и микрочастицы. Важное место в исследовании микрокомпонентов СЖ отведено экзосомам, которые в современной клеточной биологии считаются важными переносчиками информации в организме (They, 2011; Lo Cicero et al. 2015). Сообщений о выделении экзосом из СЖ опубликовано не было, наше исследование впервые установило присутствие экзосом в СЖ и доказало их природу методом иммуноцитохимии с использованием меченых антител к рецепторам CD63 и CD9. Выделение экзосом из СЖ в нашей работе стало возможным благодаря предварительным исследованиям препаратов экзосом, выделенных из других биологических жидкостей (кровь, моча, культуральная среда). Электронно-микроскопическое исследование этих образцов, позволило обнаружить в них везикулы и микрочастицы, а главное - оценить степень контаминации образцов на всех стадиях очистки и определить, каким именно способом могут быть удалены те или иные компоненты исходных биологических жидкостей. Было показано, что на конечных стадиях очистки методом последовательных центрифугирований и ультрафильтрации образцы, выделенные из разных биологических жидкостей, содержат везикулы, микрочастицы и небольшие частицы детрита. Анализ полученных результатов исследования различных биологических жидкостей позволил выбрать адекватный способ выделения экзосом из СЖ. Сопоставление состава препаратов экзосом СЖ и других исследованных жидкостей показывает, что все препараты содержат большее или меньшее количество примесей, главным образом, микрочастиц, а также слущенных везикул. Проведенное исследование показало необходимость электронно-микроскопического анализа препаратов экзосом и оценки доли примесей. Метод электронной микроскопии - единственный метод, позволяющий однозначно определить наличие мембраны у частиц и дифференцировать везикулы и микрочастицы нанометрового диапазона. Этот метод позволяет

оценить долю примесей в препаратах, которые могут повлиять на результаты молекулярно-биологических исследований экзосом.

Наше исследование однозначно установило присутствие в СЖ экзосом, которые могут быть визуализированы в нативном препарате, а не только после очистки и концентрирования, как в случае других биологических жидкостей. Следует отметить идентичность морфологии экзосом супернатантов и препаратов, полученных из СЖ путем последовательных центрифугирований, что указывает на отсутствие повреждающего действия этих процедур на экзосомы.

Наше исследование установило, что все компоненты СЖ, выявленные у здоровых людей, связаны с теми или иными структурами органа зрения и имеют свои морфологические характеристики. Для оценки информационной ценности исследования этих структур, нами была изучена СЖ больных диабетической ретинопатией (ДР) и первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ), заболеваниями, затрагивающими главным образом глубокие структуры глаза. В СЖ больных были охарактеризованы на ультраструктурном уровне клеточные, субклеточные и макромолекулярные компоненты, в том числе, установлено присутствие экзосом. Сравнительный анализ результатов электронно-микроскопического исследования СЖ здоровых людей и больных выявил четкие различия морфологических характеристик, некоторых – на ранних стадиях развития заболеваний. Так, на ранней стадии развития ПОУГ наблюдается существенный рост доли образцов СЖ, содержащих эпителиальные клетки, по сравнению со здоровыми людьми, на последующих стадиях заболевания этот показатель снижается. В группе больных ДР доля образцов, содержащих эпителиоциты, не отличается от здоровых людей. Вероятно, изменения, вызванные развитием ДР, затрагивают только определенные структуры органа зрения, в то время как развитие ПОУГ влияет на все его структуры. На ранних стадиях развития ДР наблюдается увеличение доли образцов СЖ, содержащих лейкоциты, по сравнению со здоровыми людьми. Заслуживает

внимания факт отсутствия лейкоцитов в образцах СЖ больных ПОУГ на всех стадиях заболевания, что может свидетельствовать об изменении проницаемости сосудов органа зрения уже на ранней стадии развития ПОУГ. Проведенное исследование показало, что СЖ содержит все компоненты слезной пленки. Благодаря полученным данным, стало возможным проведение сравнения состава слезной пленки, постоянно находящейся на поверхности роговицы, и СЖ, выделяющейся при стимуляции слезоотделения, что может помочь в понимании механизмов обновления слезной пленки и, возможно, установить причины его «неправильного» функционирования. Детальное ультраструктурное исследование установило, что морфологические характеристики компонентов слезной пленки меняются при развитии офтальмологических заболеваний. Таким образом, СЖ предстает в качестве универсальной информационной системы, отражающей состояние и поверхностных, и глубоких структур органа зрения. Исследование морфологических характеристик образцов СЖ больных ДР и ПОУГ помогло определить ультраструктурный эквивалент каждой стадии исследованных заболеваний.

Проведенное исследование позволило установить состав биологических компонентов СЖ здоровых людей и идентифицировать их, в том числе в СЖ обнаружены экзосомы – важнейшие переносчики молекулярной информации между клетками организма. В совокупности полученные результаты позволяют говорить о СЖ как об информационной системе, отражающей состояние органа зрения. Изменения количества и ультраструктуры компонентов, обнаруженных в СЖ людей с офтальмологическими заболеваниями, подтверждают информационную ценность исследования СЖ. Полученные данные позволили дополнить существующие представления о функционировании слезной пленки и слезного аппарата и могут быть использованы для развития методов диагностики офтальмологических заболеваний. Обнаружение в СЖ экзосом и описание их характеристик открывает новую область исследований на стыке офтальмологии и

молекулярной биологии. Развитие данного направления может привести к разработке новых методов диагностики и помочь пониманию патогенеза офтальмологических заболеваний. Таким образом, СЖ предстает как уникальный источник информации о функционировании всех структур органа зрения.

## ВЫВОДЫ

1. В слезной жидкости здоровых людей наблюдаются эпителиоциты, лейкоциты и их фрагменты (клеточный детрит). Клеточный состав слезной жидкости изменяется при развитии офтальмологических заболеваний: при диабетической ретинопатии в 2,8 раза возрастает содержание лейкоцитов, тогда как в образцах слезной жидкости больных первичной открытоугольной глаукомой лейкоциты не обнаружены.
2. Субклеточные компоненты слезной жидкости здоровых людей представлены муцинами и липидами слезной пленки, и внеклеточными везикулами – экзосомами и «мохнатыми» везикулами. Субклеточные компоненты слезной жидкости изменяются в процессе офтальмологических заболеваний: на начальных стадиях диабетической ретинопатии и первичной открытоугольной глаукомы возрастает количество «мохнатых» везикул; у больных диабетической ретинопатией снижается секреция муцинов.
3. Выявлены и описаны компоненты супернатантов слезной жидкости здоровых людей: везикулы, микрочастицы, частицы детрита и макромолекулярные агрегаты, последние по морфологическим признакам разделены на 3 основных типа. Встречаемость макромолекулярных агрегатов изменяется в слезной жидкости людей с офтальмологическими заболеваниями: при развитии первичной открытоугольной глаукоме возрастает частота встречаемости макромолекулярных агрегатов 2-го типа, при развитии диабетической ретинопатии – макромолекулярных агрегатов 3-его типа.
4. Электронно-микроскопическое исследование образцов частиц, выделенных из разных биологических жидкостей (крови, мочи, культуральной жидкости, молока и слезной жидкости) методом последовательных центрифугирований, установило присутствие во всех образцах везикул, которые по морфологическим и молекулярным

характеристикам соответствуют экзосомам. Все исследованные образцы частиц содержат структуры, не имеющие мембраны (микрочастицы), что указывает на необходимость электронно-микроскопического изучения любых образцов, предназначенных для молекулярно-биологических исследований экзосом.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Белоглазов, В. Г., Е. Д. Атькова, А. А. Федоров, Т. Н. Сафонова, Л. В. Малаева. Возможности применения метода кристаллографии слезы при патологии слезоотводящей системы. Вестник офтальмологии. // Vestn Oftalmol. - 2003. - Т. 119. – Вып. 4. - С. 49-52.
2. Бржеский, В. В., М. Радхуан Глаукома и синдром «сухого глаза» // Офтальмологические ведомости. - 2014. - Т. 7. – Вып. 2. - С. 37-49.
3. Григорьева, А. Е., С. Н. Тамкович, А. В. Еремина, А. Е. Тупикин, М. Р. Кабилов, В. В. Черных, В. В. Власов, П. П. Лактионов, Е. И. Рябчикова. Экзосомы слезной жидкости здоровых людей: выделение, идентификация и характеристика // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry. - 2016. - Т. 10. – Вып. 2. - С. 99-106
4. Сомов, Е. Е., В. В. Бржеский. Слеза. - СПб: Наука, 1994. – Стр. 156.
5. Тамкович, С. Н., В. В. Власов, П. П. Лактионов Циркулирующие дезоксирибонуклеиновые кислоты крови и их использование в медицинской диагностике. // Молекулярная биология. - 2008. - Т. 42. - С. 12-23.
6. Черных, В. В., А. П. Шваюк, О. М. Горбенко, И. Д. Сафронов, Т. А. Чехова, А. Н. Трунов, Л. А. Трунова Особенности патогенеза начальной и развитой стадии первичной открытоугольной глаукомы // Аллергология и иммунология. - 2006. - Т. 7. – Вып. 1. - С. 28-31.
7. Якушев, Д. Ю., Э. В. Бойко, А. Л. Позняк, С. Н. Сидорчук, О. В. Хлопунова, И. В. Нуралова, Д. С. Мальцев. Содержание провоспалительных цитокинов в слезной жидкости и сыворотке крови пациентов с глаукомой и катарактой. Материалы конференции «Актуальные проблемы офтальмологии». – 2011, Москва.
8. Actis, A. G., T. Rolle. Ocular surface alterations and topical antiglaucomatous therapy: a review. // Open Ophthalmol J. - 2014. - Vol. 8. - № - P. 67-72.

9. Admyre, C., S. M. Johansson, K. R. Qazi, J. J. Filen, R. Lahesmaa, M. Norman, E. P. Neve, A. Scheynius, S. Gabrielsson. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. // *J Immunol.* - 2007. - Vol. 179. - № 3. - P. 1969-1978.
10. Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhal, M. J. Wood. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. // *Nat Biotechnol.* - 2011. - Vol. 29. - № 4. - P. 341-345.
11. Andre, F., N. E. Scharz, M. Movassagh, C. Flament, P. Pautier, P. Morice, C. Pomel, C. Lhomme, B. Escudier, T. Le Chevalier, T. Tursz, S. Amigorena, G. Raposo, E. Angevin, L. Zitvogel. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. // *Lancet.* - 2002. - Vol. 360. - № 9329. - P. 295-305.
12. Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, C. F. Bennett, E. L. Pogosova-Agadjanyan, D. L. Stirewalt, J. F. Tait, M. Tewari. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2011. - Vol. 108. - № 12. - P. 5003-5008.
13. Arslan, F., R. C. Lai, M. B. Smeets, L. Akeroyd, A. Choo, E. N. Aguor, L. Timmers, H. V. van Rijen, P. A. Doevendans, G. Pasterkamp, S. K. Lim, D. P. de Kleijn. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. // *Stem Cell Res.* - 2013. - Vol. 10. - № 3. - P. 301-312.
14. Babic, A., B. M. Wolpin. Circulating Exosomes in Pancreatic Cancer: Will They Succeed on the Long, Littered Road to Early Detection Marker? // *Clin Chem.* - 2016. - Vol. 62. - № 2. - P. 307-309.
15. Baddela, V. S., V. Nayan, P. Rani, S. K. Onteru, D. Singh. Physicochemical Biomolecular Insights into Buffalo Milk-Derived Nanovesicles. // *Appl Biochem Biotechnol.* - 2016. - Vol. 178. - № 3. - P. 544-557.

16. Baranyai, T., K. Herczeg, Z. Onodi, I. Voszka, K. Modos, N. Marton, G. Nagy, I. Mager, M. J. Wood, S. El Andaloussi, Z. Palinkas, V. Kumar, P. Nagy, A. Kittel, E. I. Buzas, P. Ferdinandy, Z. Giricz. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10. - № 12. - P. e0145686.
17. Batagov, A. O., I. V. Kurochkin. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. // *Biol Direct*. - 2013. - Vol. 8. - № - P. 12.
18. Bhatnagar, S., J. S. Schorey. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. // *J Biol Chem*. - 2007a. - Vol. 282. - № 35. - P. 25779-25789.
19. Bhatnagar, S., K. Shinagawa, F. J. Castellino, J. S. Schorey. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. // *Blood*. - 2007b. - Vol. 110. - № 9. - P. 3234-3244.
20. Blanc, L., C. Barres, P. Bette-Bobillo, M. Vidal. Reticulocyte-secreted exosomes bind natural IgM antibodies: involvement of a ROS-activatable endosomal phospholipase iPLA2. // *Blood*. - 2007. - Vol. 110. - № 9. - P. 3407-3416.
21. Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo, C. Thery. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. // *Traffic*. - 2011. - Vol. 12. - № 12. - P. 1659-1668.
22. Borges, F. T., S. A. Melo, B. C. Ozdemir, N. Kato, I. Revuelta, C. A. Miller, V. H. Gattone, V. S. LeBleu, R. Kalluri. TGF-beta1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. // *J Am Soc Nephrol*. - 2013. - Vol. 24. - № 3. - P. 385-392.
23. Borrás, T. The effects of myocilin expression on functionally relevant trabecular meshwork genes: a mini-review. // *J Ocul Pharmacol Ther*. -

2014. - Vol. 30. - № 2-3. - P. 202-212.
24. Boura, E., V. Ivanov, L. A. Carlson, K. Mizuuchi, J. H. Hurley. Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. // *J Biol Chem.* - 2012. - Vol. 287. - № 33. - P. 28144-28151.
25. Bruno, S., C. Grange, M. C. Deregibus, R. A. Calogero, S. Saviozzi, F. Collino, L. Morando, A. Busca, M. Falda, B. Bussolati, C. Tetta, G. Camussi. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. // *J Am Soc Nephrol.* - 2009. - Vol. 20. - № 5. - P. 1053-1067.
26. Bryzgunova, O. E., S. N. Tamkovich, A. V. Cherepanova, S. V. Yarmoshchuk, V. I. Permyakova, O. Y. Anykeeva, P. P. Laktionov. Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients. // *Acta Naturae.* - 2015. - Vol. 7. - № 2. - P. 115-118.
27. Calzolari, A., C. Raggi, S. Deaglio, N. M. Sposi, M. Stafsnes, K. Fecchi, I. Parolini, F. Malavasi, C. Peschle, M. Sargiacomo, U. Testa. Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. // *J Cell Sci.* - 2006. - Vol. 119. - № Pt 21. - P. 4486-4498.
28. Canton, I., G. Battaglia. Endocytosis at the nanoscale. // *Chem Soc Rev.* - 2012. - Vol. 41. - № 7. - P. 2718-2739.
29. Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, K. Zen, C. Y. Zhang. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. // *Cell Res.* - 2008. - Vol. 18. - № 10. - P. 997-1006.
30. Cher, I. Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics. // *Clin Experiment Ophthalmol.* - 2012. - Vol. 40. - № 6. - P. 634-643.

31. Cheruvanky, A., H. Zhou, T. Pisitkun, J. B. Kopp, M. A. Knepper, P. S. Yuen, R. A. Star. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. // *Am J Physiol Renal Physiol.* - 2007. - Vol. 292. - № 5. - P. F1657-1661.
32. Chiasserini, D., J. R. van Weering, S. R. Piersma, T. V. Pham, A. Malekzadeh, C. E. Teunissen, H. de Wit, C. R. Jimenez. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: A comprehensive dataset. // *J Proteomics.* - 2014. - Vol. 106. - № - P. 191-204.
33. Choi, D. S., D. K. Kim, Y. K. Kim, Y. S. Gho. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. // *Mass Spectrom Rev.* - 2014. - Vol. - № - P.
34. Christianson, H. C., K. J. Svensson, T. H. van Kuppevelt, J. P. Li, M. Belting. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2013. - Vol. 110. - № 43. - P. 17380-17385.
35. Ciardiello, C., L. Cavallini, C. Spinelli, J. Yang, M. Reis-Sobreiro, P. de Candia, V. R. Minciocchi, D. Di Vizio. Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. // *Int J Mol Sci.* - 2016. - Vol. 17. - № 2. - P.
36. Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. Thery, G. Raposo. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. // *J Cell Sci.* - 2013. - Vol. 126. - № Pt 24. - P. 5553-5565.
37. Corbeel, L., K. Freson. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. // *Eur J Pediatr.* - 2008. - Vol. 167. - № 7. - P. 723-729.
38. Dai, S., D. Wei, Z. Wu, X. Zhou, X. Wei, H. Huang, G. Li. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. // *Mol Ther.* - 2008. - Vol. 16. - № 4. - P. 782-790.

39. Danjo, Y., H. Watanabe, A. S. Tisdale, M. George, T. Tsumura, M. B. Abelson, I. K. Gipson. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 1998. - Vol. 39. - № 13. - P. 2602-2609.
40. de Duve, C. The lysosome turns fifty. // *Nat Cell Biol.* - 2005. - Vol. 7. - № 9. - P. 847-849.
41. De Toro, J., L. Herschlik, C. Waldner, C. Mongini. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. // *Front Immunol.* - 2015. - Vol. 6. - № - P. 203.
42. Dismuke, W. M., P. Challa, I. Navarro, W. D. Stamer, Y. Liu. Human aqueous humor exosomes. // *Exp Eye Res.* - 2015. - Vol. 132. - № - P. 73-77.
43. Doherty, G. J., H. T. McMahon. Mechanisms of endocytosis. // *Annu Rev Biochem.* - 2009. - Vol. 78. - № - P. 857-902.
44. Eldh, M., K. Ekstrom, H. Valadi, M. Sjostrand, B. Olsson, M. Jernas, J. Lotvall. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. // *PLoS One.* - 2010. - Vol. 5. - № 12. - P. e15353.
45. Esser, J., U. Gehrman, F. L. D'Alexandri, A. M. Hidalgo-Estevez, C. E. Wheelock, A. Scheynius, S. Gabrielsson, O. Radmark. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. // *J Allergy Clin Immunol.* - 2010. - Vol. 126. - № 5. - P. 1032-1040, 1040 e1031-1034.
46. Felicetti, F., A. De Feo, C. Coscia, R. Puglisi, F. Pedini, L. Pasquini, M. Bellenghi, M. C. Errico, E. Pagani, A. Care. Exosome-mediated transfer of miR-222 is sufficient to increase tumor malignancy in melanoma. // *J Transl Med.* - 2016. - Vol. 14. - № 1. - P. 56.
47. Ferguson, S. W., J. Nguyen. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. // *J Control Release.* -

2016. - Vol. 228. - № - P. 179-190.
48. Filipenko, N. R., T. J. MacLeod, C. S. Yoon, D. M. Waisman. Annexin A2 is a novel RNA-binding protein. // *J Biol Chem.* - 2004. - Vol. 279. - № 10. - P. 8723-8731.
49. Fitzner, D., M. Schnaars, D. van Rossum, G. Krishnamoorthy, P. Dibaj, M. Bakhti, T. Regen, U. K. Hanisch, M. Simons. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. // *J Cell Sci.* - 2011. - Vol. 124. - № Pt 3. - P. 447-458.
50. Flanagan, J. L., M. D. Willcox. Role of lactoferrin in the tear film. // *Biochimie.* - 2009. - Vol. 91. - № 1. - P. 35-43.
51. Fuhrmann, G., I. K. Herrmann, M. M. Stevens. Cell-derived vesicles for drug therapy and diagnostics: Opportunities and challenges. // *Nano Today.* - 2015. - Vol. 10. - № 3. - P. 397-409.
52. Futter, C. E., I. J. White. Annexins and endocytosis. // *Traffic.* - 2007. - Vol. 8. - № 8. - P. 951-958.
53. Gamez-Valero, A., S. I. Lozano-Ramos, I. Bancu, R. Lauzurica-Valdemoros, F. E. Borrás. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. // *Front Immunol.* - 2015. - Vol. 6. - № - P. 6.
54. Garcia-Montoya, I. A., T. S. Cendon, S. Arevalo-Gallegos, Q. Rascon-Cruz. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. // *Biochim Biophys Acta.* - 2012. - Vol. 1820. - № 3. - P. 226-236.
55. Gerber, A. L., A. Harris, B. Siesky, E. Lee, T. J. Schaab, A. Huck, A. Amireskandari. Vascular Dysfunction in Diabetes and Glaucoma: A Complex Relationship Reviewed. // *J Glaucoma.* - 2015. - Vol. 24. - № 6. - P. 474-479.
56. Gipson, I. K. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 2007. - Vol. 48. - № 10. - P. 4390; 4391-4398.
57. Gong, H., J. Ruberti, D. Overby, M. Johnson, T. F. Freddo. A new view of the human trabecular meshwork using quick-freeze, deep-etch electron

- microscopy. // *Exp Eye Res.* - 2002. - Vol. 75. - № 3. - P. 347-358.
58. Gould, S. J., G. Raposo. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. // *J Extracell Vesicles.* - 2013. - Vol. 2. - № - P.
59. Grassmann, F., P. G. Schoenberger, C. Brandl, T. Schick, D. Hasler, G. Meister, M. Fleckenstein, M. Lindner, H. Helbig, S. Fauser, B. H. Weber. A circulating microrna profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration. // *PLoS One.* - 2014. - Vol. 9. - № 9. - P. e107461.
60. Green-Church, K. B., K. K. Nichols, N. M. Kleinholz, L. Zhang, J. J. Nichols. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. // *Mol Vis.* - 2008. - Vol. 14. - № - P. 456-470.
61. Guescini, M., S. Genedani, V. Stocchi, L. F. Agnati. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. // *J Neural Transm.* - 2010. - Vol. 117. - № 1. - P. 1-4.
62. Gyorgy, B., T. G. Szabo, M. Pasztoi, Z. Pal, P. Misjak, B. Aradi, V. Laszlo, E. Pallinger, E. Pap, A. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E. I. Buzas. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. // *Cell Mol Life Sci.* - 2011. - Vol. 68. - № 16. - P. 2667-2688.
63. Hannafon, B. N., K. J. Carpenter, W. L. Berry, R. Janknecht, W. C. Dooley, W. Q. Ding. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). // *Mol Cancer.* - 2015. - Vol. 14. - № 1. - P. 133.
64. Hardy, K. M., E. A. Hoffman, P. Gonzalez, B. S. McKay, W. D. Stamer. Extracellular trafficking of myocilin in human trabecular meshwork cells. // *J Biol Chem.* - 2005. - Vol. 280. - № 32. - P. 28917-28926.
65. Herber, S., F. H. Grus, P. Sabuncuo, A. J. Augustin. Two-dimensional analysis of tear protein patterns of diabetic patients. // *Electrophoresis.* - 2001. - Vol. 22. - № 9. - P. 1838-1844.
66. Hoffman, E. A., K. M. Perkumas, L. M. Highstrom, W. D. Stamer. Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular

- meshwork cells. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 2009. - Vol. 50. - № 3. - P. 1313-1318.
67. Hoshino, D., K. C. Kirkbride, K. Costello, E. S. Clark, S. Sinha, N. Grega-Larson, M. J. Tyska, A. M. Weaver. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. // *Cell Rep.* - 2013. - Vol. 5. - № 5. - P. 1159-1168.
68. Huber, V., S. Fais, M. Iero, L. Lugini, P. Canese, P. Squarcina, A. Zaccheddu, M. Colone, G. Arancia, M. Gentile, E. Seregni, R. Valenti, G. Ballabio, F. Belli, E. Leo, G. Parmiani, L. Rivoltini. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. // *Gastroenterology.* - 2005. - Vol. 128. - № 7. - P. 1796-1804.
69. Hwang, D. E., J. H. Ryou, J. R. Oh, J. W. Han, T. K. Park, H. S. Kim. Anti-Human VEGF Repebody Effectively Suppresses Choroidal Neovascularization and Vascular Leakage. // *PLoS One.* - 2016. - Vol. 11. - № 3. - P. e0152522.
70. Ismail, N., Y. Wang, D. Dakhllallah, L. Moldovan, K. Agarwal, K. Batte, P. Shah, J. Wisler, T. D. Eubank, S. Tridandapani, M. E. Paulaitis, M. G. Piper, C. B. Marsh. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. // *Blood.* - 2013. - Vol. 121. - № 6. - P. 984-995.
71. Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gomez, J. Archer, S. C. Hatch, I. Erkizia, J. Blanco, F. E. Borrás, M. C. Puertas, J. H. Connor, M. T. Fernandez-Figueras, L. Moore, B. Clotet, S. Gummuluru, J. Martinez-Picado. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. // *Blood.* - 2009. - Vol. 113. - № 12. - P. 2732-2741.
72. Johansen, F. E., C. S. Kaetzel. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. // *Mucosal Immunol.* - 2011. - Vol. 4. - № 6. - P. 598-602.

73. Johnson, M., J. W. McLaren, D. R. Overby. Unconventional aqueous humor outflow: A review. // *Exp Eye Res.* - 2016. - Vol. - № - P.
74. Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, C. Turbide. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). // *J Biol Chem.* - 1987. - Vol. 262. - № 19. - P. 9412-9420.
75. Johnstone, R. M., A. Bianchini, K. Teng. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. // *Blood.* - 1989. - Vol. 74. - № 5. - P. 1844-1851.
76. Kahlert, C., S. A. Melo, A. Protopopov, J. Tang, S. Seth, M. Koch, J. Zhang, J. Weitz, L. Chin, A. Futreal, R. Kalluri. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. // *J Biol Chem.* - 2014. - Vol. 289. - № 7. - P. 3869-3875.
77. Kawai, S., T. Nakajima, S. Hokari, T. Komoda, K. Kawai. Apolipoprotein A-I concentration in tears in diabetic retinopathy. // *Ann Clin Biochem.* - 2002. - Vol. 39. - № Pt 1. - P. 56-61.
78. Keijser, S., J. A. van Best, A. Van der Lelij, M. J. Jager. Reflex and steady state tears in patients with latent stromal herpetic keratitis. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 2002. - Vol. 43. - № 1. - P. 87-91.
79. Khan, S., J. M. Jutzy, M. M. Valenzuela, D. Turay, J. R. Aspe, A. Ashok, S. Mirshahidi, D. Mercola, M. B. Lilly, N. R. Wall. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7. - № 10. - P. e46737.
80. Kim, S. W., S. J. Kim, R. R. Langley, I. J. Fidler. Modulation of the cancer cell transcriptome by culture media formulations and cell density. // *Int J Oncol.* - 2015. - Vol. 46. - № 5. - P. 2067-2075.
81. King-Smith, P. E., J. J. Nichols, R. J. Braun, K. K. Nichols. High resolution microscopy of the lipid layer of the tear film. // *Ocul Surf.* - 2011. - Vol. 9. -

- № 4. - P. 197-211.
82. King, J. B., R. J. von Furstenberg, B. J. Smith, K. K. McNaughton, J. A. Galanko, S. J. Henning. CD24 can be used to isolate Lgr5+ putative colonic epithelial stem cells in mice. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 2012. - Vol. 303. - № 4. - P. G443-452.
83. Kramer-Albers, E. M., N. Bretz, S. Tenzer, C. Winterstein, W. Mobius, H. Berger, K. A. Nave, H. Schild, J. Trotter. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? // *Proteomics Clin Appl.* - 2007. - Vol. 1. - № 11. - P. 1446-1461.
84. Lasser, C. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle. // *Expert Opin Biol Ther.* - 2015. - Vol. 15. - № 1. - P. 103-117.
85. Lasser, C., V. S. Alikhani, K. Ekstrom, M. Eldh, P. T. Paredes, A. Bossios, M. Sjostrand, S. Gabrielsson, J. Lotvall, H. Valadi. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. // *J Transl Med.* - 2011. - Vol. 9. - № - P. 9.
86. Lasser, C., M. Eldh, J. Lotvall. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. // *J Vis Exp.* - 2012. - Vol. - № 59. - P. e3037.
87. Lema, I., J. A. Duran. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. // *Ophthalmology.* - 2005. - Vol. 112. - № 4. - P. 654-659.
88. Lemp, M. A., H. J. Blackman. Ocular surface defense mechanisms. // *Ann Ophthalmol.* - 1981. - Vol. 13. - № 1. - P. 61-63.
89. Li, M., E. Zeringer, T. Barta, J. Schageman, A. Cheng, A. V. Vlassov. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* - 2014. - Vol. 369. - № 1652. - P.
90. Li, X., Z. Wang. Prevalence and incidence of retinopathy in elderly diabetic patients receiving early diagnosis and treatment. // *Exp Ther Med.* - 2013. - Vol. 5. - № 5. - P. 1393-1396.

91. Liu, W., H. Li, D. Lu, J. Liang, X. Xing, A. Liu, S. Zhao, X. Li, J. Ji. The tear fluid mucin 5AC change of primary angle-closure glaucoma patients after short-term medications and phacotrabeculectomy. // *Mol Vis.* - 2010. - Vol. 16. - № - P. 2342-2346.
92. Llorente, A., T. Skotland, T. Sylvanne, D. Kauhanen, T. Rog, A. Orłowski, I. Vattulainen, K. Ekroos, K. Sandvig. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. // *Biochim Biophys Acta.* - 2013. - Vol. 1831. - № 7. - P. 1302-1309.
93. Lo Cicero, A., P. D. Stahl, G. Raposo. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. // *Curr Opin Cell Biol.* - 2015. - Vol. 35. - № - P. 69-77.
94. Locke, C. J., N. R. Congrove, W. M. Dismuke, T. J. Bowen, W. D. Stamer, B. S. McKay. Controlled exosome release from the retinal pigment epithelium in situ. // *Exp Eye Res.* - 2014. - Vol. 129. - № - P. 1-4.
95. Lonnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. // *Am J Clin Nutr.* - 2003. - Vol. 77. - № 6. - P. 1537S-1543S.
96. Looze, C., D. Yui, L. Leung, M. Ingham, M. Kaler, X. Yao, W. W. Wu, R. F. Shen, M. P. Daniels, S. J. Levine. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2009. - Vol. 378. - № 3. - P. 433-438.
97. Lotvall, J., A. F. Hill, F. Hochberg, E. I. Buzas, D. Di Vizio, C. Gardiner, Y. S. Gho, I. V. Kurochkin, S. Mathivanan, P. Quesenberry, S. Sahoo, H. Tahara, M. H. Wauben, K. W. Witwer, C. Thery. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. // *J Extracell Vesicles.* - 2014. - Vol. 3. - № - P. 26913.
98. Luketic, L., J. Delanghe, P. T. Sobol, P. Yang, E. Frotten, K. L. Mossman, J. Gauldie, J. Bramson, Y. Wan. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. // *J Immunol.* - 2007. - Vol. 179. - № 8. - P. 5024-5032.

99. Luzio, J. P., P. R. Pryor, N. A. Bright. Lysosomes: fusion and function. // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2007. - Vol. 8. - № 8. - P. 622-632.
100. MacKenzie, A., H. L. Wilson, E. Kiss-Toth, S. K. Dower, R. A. North, A. Surprenant. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. // Immunity. - 2001. - Vol. 15. - № 5. - P. 825-835.
101. Maitchouk, D. Y., R. W. Beuerman, T. Ohta, M. Stern, R. J. Varnell. Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. // Arch Ophthalmol. - 2000. - Vol. 118. - № 2. - P. 246-252.
102. Mantelli, F., P. Argueso. Functions of ocular surface mucins in health and disease. // Curr Opin Allergy Clin Immunol. - 2008. - Vol. 8. - № 5. - P. 477-483.
103. Mathivanan, S., J. W. Lim, B. J. Tauro, H. Ji, R. L. Moritz, R. J. Simpson. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. // Mol Cell Proteomics. - 2010. - Vol. 9. - № 2. - P. 197-208.
104. McCoy-Simandle, K., S. J. Hanna, D. Cox. Exosomes and nanotubes: Control of immune cell communication. // Int J Biochem Cell Biol. - 2016. - Vol. 71. - № - P. 44-54.
105. McMenamin, P. G., W. R. Lee. Age related changes in extracellular materials in the inner wall of Schlemm's canal. // Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. - 1980. - Vol. 212. - № 3-4. - P. 159-172.
106. Merino-Gonzalez, C., F. A. Zuniga, C. Escudero, V. Ormazabal, C. Reyes, E. Nova-Lamperti, C. Salomon, C. Aguayo. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potential Clinical Application. // Front Physiol. - 2016. - Vol. 7. - № - P. 24.
107. Mimeault, M., S. K. Batra. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. -

2014. - Vol. 23. - № 2. - P. 234-254.
108. Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogossova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, M. Tewari. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2008. - Vol. 105. - № 30. - P. 10513-10518.
109. Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, S. Nagata. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. // Nature. - 2007. - Vol. 450. - № 7168. - P. 435-439.
110. Momen-Heravi, F., L. Balaj, S. Alian, A. J. Trachtenberg, F. H. Hochberg, J. Skog, W. P. Kuo. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. // Front Physiol. - 2012. - Vol. 3. - № - P. 162.
111. Morel, L., M. Regan, H. Higashimori, S. K. Ng, C. Esau, S. Vidensky, J. Rothstein, Y. Yang. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. // J Biol Chem. - 2013. - Vol. 288. - № 10. - P. 7105-7116.
112. Nagata, M., S. Muto, S. Horie. Molecular Biomarkers in Bladder Cancer: Novel Potential Indicators of Prognosis and Treatment Outcomes. // Dis Markers. - 2016. - Vol. 2016. - № - P. 8205836.
113. Narita, M., T. Kanda, T. Abe, T. Uchiyama, M. Iwafuchi, Z. Zheng, A. Liu, T. Kaifu, S. Kosugi, M. Minagawa, K. Itoh, M. Takahashi. Immune responses in patients with esophageal cancer treated with SART1 peptide-pulsed dendritic cell vaccine. // Int J Oncol. - 2015. - Vol. 46. - № 4. - P. 1699-1709.
114. Natasha, G., B. Gundogan, A. Tan, Y. Farhatnia, W. Wu, J. Rajadas, A. M. Seifalian. Exosomes as immunotheranostic nanoparticles. // Clin Ther. - 2014. - Vol. 36. - № 6. - P. 820-829.
115. Navabi, H., D. Croston, J. Hobot, A. Clayton, L. Zitvogel, B. Jasani,

- R. Bailey-Wood, K. Wilson, Z. Tabi, M. D. Mason, M. Adams. Preparation of human ovarian cancer ascites-derived exosomes for a clinical trial. // *Blood Cells Mol Dis.* - 2005. - Vol. 35. - № 2. - P. 149-152.
116. Nawaz, M., G. Camussi, H. Valadi, I. Nazarenko, K. Ekstrom, X. Wang, S. Principe, N. Shah, N. M. Ashraf, F. Fatima, L. Nader, T. Kislinger. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. // *Nat Rev Urol.* - 2014. - Vol. 11. - № 12. - P. 688-701.
117. Nazarenko, I., S. Rana, A. Baumann, J. McAlear, A. Hellwig, M. Trendelenburg, G. Lochnit, K. T. Preissner, M. Zoller. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. // *Cancer Res.* - 2010. - Vol. 70. - № 4. - P. 1668-1678.
118. Ng, V., P. Cho. The relationship between total tear protein concentrations determined by different methods and standards. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* - 2000. - Vol. 238. - № 7. - P. 571-576.
119. Nichols, B., C. R. Dawson, B. Togni. Surface features of the conjunctiva and cornea. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 1983. - Vol. 24. - № 5. - P. 570-576.
120. Nichols, B. A., M. L. Chiappino, C. R. Dawson. Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 1985. - Vol. 26. - № 4. - P. 464-473.
121. Noecker, R. J., L. A. Herrygers, R. Anwaruddin. Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. // *Cornea.* - 2004. - Vol. 23. - № 5. - P. 490-496.
122. Nomura, K., E. Takamura. Tear IgE concentrations in allergic conjunctivitis. // *Eye (Lond).* - 1998. - Vol. 12 ( Pt 2). - № - P. 296-298.
123. Ogorevc, E., V. Kralj-Iglic, P. Veranic. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. // *Radiol Oncol.* - 2013. - Vol. 47. - № 3. - P. 197-205.
124. Ohashi, Y., M. Dogru, K. Tsubota. Laboratory findings in tear fluid

- analysis. // *Clin Chim Acta.* - 2006. - Vol. 369. - № 1. - P. 17-28.
125. Ohno, S., M. Takanashi, K. Sudo, S. Ueda, A. Ishikawa, N. Matsuyama, K. Fujita, T. Mizutani, T. Ohgi, T. Ochiya, N. Gotoh, M. Kuroda. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. // *Mol Ther.* - 2013. - Vol. 21. - № 1. - P. 185-191.
126. Palma, J., S. C. Yaddanapudi, L. Pigati, M. A. Havens, S. Jeong, G. A. Weiner, K. M. Weimer, B. Stern, M. L. Hastings, D. M. Duelli. MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - Vol. 40. - № 18. - P. 9125-9138.
127. Pan, B. T., R. Blostein, R. M. Johnstone. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. // *Biochem J.* - 1983a. - Vol. 210. - № 1. - P. 37-47.
128. Pan, B. T., R. Johnstone. Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis. // *J Biol Chem.* - 1984. - Vol. 259. - № 15. - P. 9776-9782.
129. Pan, B. T., R. M. Johnstone. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. // *Cell.* - 1983b. - Vol. 33. - № 3. - P. 967-978.
130. Park, K. S., S. S. Kim, J. C. Kim, H. C. Kim, Y. S. Im, C. W. Ahn, H. K. Lee. Serum and tear levels of nerve growth factor in diabetic retinopathy patients. // *Am J Ophthalmol.* - 2008. - Vol. 145. - № 3. - P. 432-437.
131. Pelkmans, L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. // *Biochim Biophys Acta.* - 2005. - Vol. 1746. - № 3. - P. 295-304.
132. Perkumas, K. M., E. A. Hoffman, B. S. McKay, R. R. Allingham, W. D. Stamer. Myocilin-associated exosomes in human ocular samples. // *Exp Eye Res.* - 2007. - Vol. 84. - № 1. - P. 209-212.
133. Pieters, B. C., O. J. Arntz, M. B. Bennink, M. G. Broeren, A. P. van

- Caam, M. I. Koenders, P. L. van Lent, W. B. van den Berg, M. de Vries, P. M. van der Kraan, F. A. van de Loo. Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF-beta. // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10. - № 3. - P. e0121123.
134. Piper, R. C., J. P. Luzio Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. // *Curr Opin Cell Biol*. - 2007. - Vol. 19. - № 4. - P. 459-465.
135. Pitt, J. M., M. Charrier, S. Viaud, F. Andre, B. Besse, N. Chaput, L. Zitvogel. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. // *J Immunol*. - 2014. - Vol. 193. - № 3. - P. 1006-1011.
136. Polansky, J. R., D. J. Fauss, P. Chen, H. Chen, E. Lutjen-Drecoll, D. Johnson, R. M. Kurtz, Z. D. Ma, E. Bloom, T. D. Nguyen Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. // *Ophthalmologica*. - 1997. - Vol. 211. - № 3. - P. 126-139.
137. Pols, M. S., J. Klumperman. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. // *Exp Cell Res*. - 2009. - Vol. 315. - № 9. - P. 1584-1592.
138. Pozarowska, D., P. Pozarowski, Z. Darzynkiewicz. Cytometric assessment of cytostatic and cytotoxic effects of topical glaucoma medications on human epithelial corneal line cells. // *Cytometry B Clin Cytom*. - 2010. - Vol. 78. - № 2. - P. 130-137.
139. Prunotto, M., A. Farina, L. Lane, A. Pernin, J. Schifferli, D. F. Hochstrasser, P. Lescuyer, S. Moll. Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. // *J Proteomics*. - 2013. - Vol. 82. - № - P. 193-229.
140. Ragusa, M., C. Barbagallo, L. Statello, R. Caltabiano, A. Russo, L. Puzzo, T. Avitabile, A. Longo, M. D. Toro, D. Barbagallo, H. Valadi, C. Di Pietro, M. Purrello, M. Reibaldi. miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications. // *Cancer Biol Ther*. - 2015. - Vol. 16. - № 9. - P.

- 1387-1396.
141. Rajendran, L., K. Simons. Lipid rafts and membrane dynamics. // *J Cell Sci.* - 2005. - Vol. 118. - № Pt 6. - P. 1099-1102.
  142. Rantamaki, A. H., T. Seppanen-Laakso, M. Oresic, M. Jauhiainen, J. M. Holopainen. Human tear fluid lipidome: from composition to function. // *PLoS One.* - 2011. - Vol. 6. - № 5. - P. e19553.
  143. Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, H. J. Geuze. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. // *J Exp Med.* - 1996. - Vol. 183. - № 3. - P. 1161-1172.
  144. Record, M. Exosomal Lipids in Cell–Cell Communication. Emerging Concepts of Tumor Exosome-Mediated Cell–Cell Communication. Editor: H.G. Zhang. – 2011. – P. 47-68.
  145. Record, M., K. Carayon, M. Poirot, S. Silvente-Poirot. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologies. // *Biochim Biophys Acta.* - 2014. - Vol. 1841. - № 1. - P. 108-120.
  146. Record, M., C. Subra, S. Silvente-Poirot, M. Poirot. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. // *Biochem Pharmacol.* - 2011. - Vol. 81. - № 10. - P. 1171-1182.
  147. Rohen, J. W., R. Futa, E. Lutjen-Drecoll. The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 1981. - Vol. 21. - № 4. - P. 574-585.
  148. Royo, F., P. Zuniga-Garcia, P. Sanchez-Mosquera, A. Egia, A. Perez, A. Loizaga, R. Arceo, I. Lacasa, A. Rabade, E. Arrieta, R. Bilbao, M. Unda, A. Carracedo, J. M. Falcon-Perez. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. // *J Extracell Vesicles.* - 2016. - Vol. 5. - № - P. 29497.
  149. Runz, S., S. Keller, C. Rupp, A. Stoeck, Y. Issa, D. Koensgen, A.

- Mustea, J. Sehouli, G. Kristiansen, P. Altevogt. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. // *Gynecol Oncol.* - 2007. - Vol. 107. - № 3. - P. 563-571.
150. Santonocito, M., M. Vento, M. R. Guglielmino, R. Battaglia, J. Wahlgren, M. Ragusa, D. Barbagallo, P. Borzi, S. Rizzari, M. Maugeri, P. Scollo, C. Tatone, H. Valadi, M. Purrello, C. Di Pietro. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. // *Fertil Steril.* - 2014. - Vol. 102. - № 6. - P. 1751-1761 e1751.
151. Sato-Kuwabara, Y., S. A. Melo, F. A. Soares, G. A. Calin. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review). // *Int J Oncol.* - 2015. - Vol. 46. - № 1. - P. 17-27.
152. Shelke, G. V., C. Lasser, Y. S. Gho, J. Lotvall. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. // *J Extracell Vesicles.* - 2014. - Vol. 3. - № - P.
153. Skriner, K., K. Adolph, P. R. Jungblut, G. R. Burmester. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. // *Arthritis Rheum.* - 2006. - Vol. 54. - № 12. - P. 3809-3814.
154. Souchier, M., N. Buron, P. O. Lafontaine, A. M. Bron, C. Baudouin, C. Creuzot-Garcher. Trefoil factor family 1, MUC5AC and human leucocyte antigen-DR expression by conjunctival cells in patients with glaucoma treated with chronic drugs: could these markers predict the success of glaucoma surgery? // *Br J Ophthalmol.* - 2006. - Vol. 90. - № 11. - P. 1366-1369.
155. Spielmann, N., D. T. Wong. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. // *Oral Dis.* - 2011. - Vol. 17. - № 4. - P. 345-354.
156. Stamer, W. D., E. A. Hoffman, J. M. Luther, D. L. Hachey, K. L.

- Schey. Protein profile of exosomes from trabecular meshwork cells. // *J Proteomics*. - 2011. - Vol. 74. - № 6. - P. 796-804.
157. Stolwijk, T. R., A. Kuizenga, N. J. van Haeringen, A. Kijlstra, J. A. Oosterhuis, J. A. van Best. Analysis of tear fluid proteins in insulin-dependent diabetes mellitus. // *Acta Ophthalmol (Copenh)*. - 1994. - Vol. 72. - № 3. - P. 357-362.
158. Street, J. M., P. E. Barran, C. L. Mackay, S. Weidt, C. Balmforth, T. S. Walsh, R. T. Chalmers, D. J. Webb, J. W. Dear. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. // *J Transl Med*. - 2012. - Vol. 10. - № - P. 5.
159. Stuchell, R. N., J. J. Feldman, R. L. Farris, I. D. Mandel. The effect of collection technique on tear composition. // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. - 1984. - Vol. 25. - № 3. - P. 374-377.
160. Subra, C., D. Grand, K. Laulagnier, A. Stella, G. Lambeau, M. Paillasse, P. De Medina, B. Monsarrat, B. Perret, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, M. Record. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. // *J Lipid Res*. - 2010. - Vol. 51. - № 8. - P. 2105-2120.
161. Sun, D., X. Zhuang, X. Xiang, Y. Liu, S. Zhang, C. Liu, S. Barnes, W. Grizzle, D. Miller, H. G. Zhang. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. // *Mol Ther*. - 2010. - Vol. 18. - № 9. - P. 1606-1614.
162. Takahashi, R. H., T. A. Milner, F. Li, E. E. Nam, M. A. Edgar, H. Yamaguchi, M. F. Beal, H. Xu, P. Greengard, G. K. Gouras. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. // *Am J Pathol*. - 2002. - Vol. 161. - № 5. - P. 1869-1879.
163. Takata, K., T. Matsuzaki, Y. Tajika, A. Ablimit, T. Hasegawa. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. // *Histochem Cell Biol*. - 2008. - Vol. 130. - № 2. - P. 197-209.

164. Tamm, E. R., P. Russell, D. L. Epstein, D. H. Johnson, J. Piatigorsky. Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 1999. - Vol. 40. - № 11. - P. 2577-2582.
165. Tasaki, M., M. Ueda, S. Ochiai, Y. Tanabe, S. Murata, Y. Misumi, Y. Su, X. Sun, S. Shinriki, H. Jono, M. Shono, K. Obayashi, Y. Ando. Transmission of circulating cell-free AA amyloid oligomers in exosomes vectors via a prion-like mechanism. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2010. - Vol. 400. - № 4. - P. 559-562.
166. Thakur, B. K., H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J. M. Silva, W. Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado, D. Lyden. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. // *Cell Res.* - 2014. - Vol. 24. - № 6. - P. 766-769.
167. They, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. // *F1000 Biol Rep.* - 2011. - Vol. 3. - № - P. 15.
168. They, C., S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. // *Curr Protoc Cell Biol.* - 2006. - Vol. Chapter 3. - № - P. Unit 3 22.
169. Trams, E. G., C. J. Lauter, N. Salem, Jr., U. Heine. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. // *Biochim Biophys Acta.* - 1981. - Vol. 645. - № 1. - P. 63-70.
170. Tuft, S. J., J. K. Dart. The measurement of IgE in tear fluid: a comparison of collection by sponge or capillary. // *Acta Ophthalmol (Copenh).* - 1989. - Vol. 67. - № 3. - P. 301-305.
171. Vader, P., X. O. Breakefield, M. J. Wood. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. // *Trends Mol Med.* - 2014. - Vol. 20. - № 7. - P. 385-393.
172. Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, J. O. Lotvall. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel

- mechanism of genetic exchange between cells. // *Nat Cell Biol.* - 2007. - Vol. 9. - № 6. - P. 654-659.
173. van der Vos, K. E., L. Balaj, J. Skog, X. O. Breakefield. Brain tumor microvesicles: insights into intercellular communication in the nervous system. // *Cell Mol Neurobiol.* - 2011. - Vol. 31. - № 6. - P. 949-959.
174. van Haeringen, N. J., E. J. van Agtmaal. Fibrinolytic activity in human tears. // *Exp Eye Res.* - 1989. - Vol. 48. - № 3. - P. 461-464.
175. van Meel, E., J. Klumperman. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. // *Histochem Cell Biol.* - 2008. - Vol. 129. - № 3. - P. 253-266.
176. Villarroya-Beltri, C., F. Baixauli, C. Gutierrez-Vazquez, F. Sanchez-Madrid, M. Mittelbrunn. Sorting it out: Regulation of exosome loading. // *Semin Cancer Biol.* - 2014. - Vol. 28. - № - P. 3-13.
177. Villarroya-Beltri, C., C. Gutierrez-Vazquez, F. Sanchez-Cabo, D. Perez-Hernandez, J. Vazquez, N. Martin-Cofreces, D. J. Martinez-Herrera, A. Pascual-Montano, M. Mittelbrunn, F. Sanchez-Madrid. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. // *Nat Commun.* - 2013. - Vol. 4. - № - P. 2980.
178. Vital-Reyes, V. S., C. Rodriguez-Burford, D. K. Oelschlager, W. E. Grizzle. Cell density influences the effect of celecoxib in two carcinoma cell lines. // *Biotech Histochem.* - 2006. - Vol. 81. - № 1. - P. 51-54.
179. Vlassov, A. V., S. Magdaleno, R. Setterquist, R. Conrad. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. // *Biochim Biophys Acta.* - 2012. - Vol. 1820. - № 7. - P. 940-948.
180. Wang, K., S. Zhang, J. Weber, D. Baxter, D. J. Galas. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. // *Nucleic Acids Res.* - 2010. - Vol. 38. - № 20. - P. 7248-7259.
181. Wolff, E. The muco-cutaneous junction of the lid-margin and the distribution of the tear fluid. // *Trans Ophthalmol Soc U K.* - 1946. - Vol. 66.

- № - P. 291-308.
182. Wollensak, G., E. Mur, A. Mayr, G. Baier, W. Gottinger, G. Stoffler. Effective methods for the investigation of human tear film proteins and lipids. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* - 1990. - Vol. 228. - № 1. - P. 78-82.
183. Wyffels, J. T. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications, Fourth Edition, by M. A. Hayat. // *Microsc Microanal.* - 2001. - Vol. 7. - № 1. - P. 66.
184. Xu, J. F., G. H. Yang, X. H. Pan, S. J. Zhang, C. Zhao, B. S. Qiu, H. F. Gu, J. F. Hong, L. Cao, Y. Chen, B. Xia, Q. Bi, Y. P. Wang. Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. // *PLoS One.* - 2014. - Vol. 9. - № 12. - P. e114627.
185. Yamashita, T., Y. Takahashi, M. Nishikawa, Y. Takakura. Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. // *Eur J Pharm Biopharm.* - 2016. - Vol. 98. - № - P. 1-8.
186. Yanez-Mo, M., P. R. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borrás, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colas, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E. M. Kramer-Albers, S. Laitinen, C. Lasser, T. Lener, E. Ligeti, A. Line, G. Lipps, A. Llorente, J. Lotvall, M. Mancek-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. Nolte-'t Hoen, T. A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, E. Pallinger, H. A. Del Portillo, J. Reventos, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sanchez-Madrid, N. Santarem, K. Schallmoser, M. S. Ostendorf, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van der Grein, M. H. Vasconcelos, M. H. Wauben, O. De Wever. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. // *J Extracell Vesicles.* - 2015. - Vol. 4. - № -

- P. 27066.
187. Yuana, Y., A. N. Boing, A. E. Grootemaat, E. van der Pol, C. M. Hau, P. Cizmar, E. Buhr, A. Sturk, R. Nieuwland. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. // *J Extracell Vesicles*. - 2015. - Vol. 4. - № - P. 29260.
188. Zhong, J., Y. Chen, L. J. Wang. Emerging molecular basis of hematogenous metastasis in gastric cancer. // *World J Gastroenterol*. - 2016. - Vol. 22. - № 8. - P. 2434-2440.
189. Zhou, H., T. Pisitkun, A. Aponte, P. S. Yuen, J. D. Hoffert, H. Yasuda, X. Hu, L. Chawla, R. F. Shen, M. A. Knepper, R. A. Star. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. // *Kidney Int*. - 2006. - Vol. 70. - № 10. - P. 1847-1857.
190. Zhou, L., R. W. Beuerman. Tear analysis in ocular surface diseases. // *Prog Retin Eye Res*. - 2012. - Vol. 31. - № 6. - P. 527-550.
191. Zumaquero, E., P. Munoz, M. Cobo, G. Lucena, E. J. Pavon, A. Martin, P. Navarro, A. Garcia-Perez, A. Ariza-Veguillas, F. Malavasi, J. Sancho, M. Zubiaur. Exosomes from human lymphoblastoid B cells express enzymatically active CD38 that is associated with signaling complexes containing CD81, Hsc-70 and Lyn. // *Exp Cell Res*. - 2010. - Vol. 316. - № 16. - P. 2692-2706.