

На правах рукописи

**Григорьева Алина Евгеньевна**

**Слезная жидкость как субстрат для оценки состояния  
структур глаза**

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Томск - 2016**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Рябчикова  
Елена Ивановна**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией ультраструктурных  
исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт клинической и экспериментальной  
лимфологии» (г. Новосибирск)

**Бгатова  
Наталья Петровна**

доктор биологических наук, доцент кафедры  
морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО  
«Сибирский государственный медицинский  
университет Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (г. Томск)

**Мильто  
Иван Васильевич**

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится: «\_\_» \_\_\_\_\_2016 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (634050, Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Герасимов Александр Владимирович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Нарастающая нагрузка на глаза неуклонно приводит к снижению остроты зрения и возрастанию частоты офтальмологических заболеваний. Несмотря на прогресс в офтальмологии, остаются нерешенными проблемы, связанные с патогенезом и ранней диагностикой заболеваний глаз. В офтальмологической практике применяют различные методы, основанные на визуализации структур глаза, однако, они не дают представления о состоянии глубоких тканей, которые доступны для комплексного анализа лишь при нарушении целостности органа зрения. В связи с этим, актуальным является поиск новых способов оценки состояния структур глаза, и внимание исследователей привлекает легко и атравматично доступная слезная жидкость (СЖ). В клиническую практику внедряются биохимические и иммунологические исследования СЖ [Stolwijk T.R. et al., 1994; Черных В.В. и соавт., 2006; Якушев Д.Ю. и соавт., 2011], тогда как электронно-микроскопический (ЭМ) анализ компонентов СЖ, которые могут отражать состояние структур органа зрения, не проводился. Между тем, СЖ априори содержит слущенные эпителиальные клетки, их фрагменты, различные макромолекулярные структуры, и, возможно, их ультраструктура может изменяться при заболеваниях глаза. Проверке этого предположения и посвящена данная работа.

Исследование СЖ здоровых людей с помощью просвечивающей ЭМ необходимо для идентификации и описания клеточных и субклеточных её компонентов. Различные заболевания могут приводить к разным изменениям морфологии компонентов СЖ и, чтобы установить это, исследовали СЖ больных тяжелыми офтальмологическими заболеваниями - диабетической ретинопатией (ДР) и первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ). Диабетическая ретинопатия – микроангиопатия и, хотя основной зоной поражения является сетчатка, в патологический процесс вовлекаются все структуры органа зрения. При ПОУГ патологические изменения затрагивают в основном глубокие структуры глаза, соответственно, СЖ может не отражать данные процессы.

Потенциально в СЖ могут присутствовать внеклеточные везикулы, предположительно играющие важную роль в физиологических и патологических процессах, протекающих в организме [Fuhrmann G. et al., 2015; Lasser C., 2015; Sato-Kuwabara Y. et al., 2015]. Вероятно, внеклеточные везикулы СЖ могут стать источником диагностической информации и помочь пониманию механизмов патогенеза заболеваний глаза.

**Степень разработанности темы исследования.** Оценка свойств СЖ используется в офтальмологической практике для диагностики синдрома «сухого глаза», однако, диагностический потенциал СЖ этим не ограничивается. Очевидно, морфологические характеристики СЖ, постоянно контактирующей с передней поверхностью органа зрения, изменяются при офтальмологических заболеваниях, однако, ультраструктура компонентов СЖ и ее изменения при офтальмологических заболеваниях не изучены.

**Цель исследования.** Изучить субмикроскопический состав слезной жидкости здоровых людей и определить её компоненты, изменяющиеся при диабетической ретинопатии и первичной открытоугольной глаукоме.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать в сравнительном аспекте клеточный и субклеточный состав слезной жидкости здоровых людей и больных диабетической ретинопатией и первичной открытоугольной глаукомой методом ультратонких срезов.
2. Исследовать в сравнительном аспекте состав макромолекулярных компонентов и субмикроскопических частиц слезной жидкости здоровых людей и больных диабетической ретинопатией и первичной открытоугольной глаукомой 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 выявлены эпителиоциты и лейкоциты, субклеточные структуры (компоненты слезной пленки, клеточный детрит и внеклеточные везикулы, ряд которых по морфологическим признакам может быть отнесен к экзосомам), а также макромолекулярные агрегаты. Впервые описаны различия состава СЖ здоровых людей и 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, иммуноцитохимически подтверждена природа 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 образцах микрочастиц, способных исказить результаты молекулярно-биологических исследований экзосом.

**Теоретическая и практическая значимость.** В работе получены данные о клеточном и субклеточном составе СЖ и его изменениях при развитии ДР и ПОУГ, которые могут быть использованы в клинической практике для выявления данных заболеваний и изучения их патогенеза. Предложен метод выделения экзосом из СЖ, оценена доля экзосом в полученных образцах и подтверждена природа выделенных везикул с помощью иммуно-электронной микроскопии. Данные исследования являются необходимой базой при изучении 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, это определяет необходимость ЭМ анализа образцов, предназначенных для исследования экзосом, для адекватной оценки результатов молекулярно-биологического анализа.

**Методология и методы исследования.** Для решения поставленных задач были использованы высокоинформативные методы исследования, которые позволили получить точные представления об ультраструктуре всех компонентов объектов исследования – СЖ людей и образцов экзосом, выделенных из разных биологических жидкостей. Исследования проводились на базе лабораторий Института химической биологии и фундаментальной медицины. Основные методы исследования: электронная и иммуно-электронная микроскопия, методы негативного контрастирования и ультратонких срезов, морфометрический анализ, метод последовательных центрифугирований для выделения экзосом из биологических жидкостей.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Слезная жидкость здоровых людей содержит клетки (эпителиоциты и лейкоциты), субклеточные компоненты (липиды и муцины, белки в виде

макромолекулярных агрегатов и микрочастиц), 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, по морфологическим параметрам и присутствию основных маркеров, не отличающиеся от экзосом, содержащихся в других биологических жидкостях.

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая степень достоверности результатов работы обеспечивается достаточным объемом экспериментального материала и использованием современных методов исследования и высокотехнологичного оборудования.

Материалы диссертации были представлены на научной конференции «Фундаментальные науки – медицине», посвященной 10-летию факультета медицинский наук НГУ (Новосибирск, 2013), на научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной офтальмологии» (Новосибирск, 2013), на всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные исследования в офтальмологии» (Новосибирск, 2014), на I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2014), на II Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2015) и всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-2015» (Новосибирск, 2015).

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

**Личное участие автора.** Эксперименты по ЭМ изучению компонентов слезной жидкости и образцов частиц, выделенных из культуральной жидкости, крови, мочи, молока и слезной жидкости были выполнены автором самостоятельно.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, а

также выводы и список литературы, в котором 191 ссылка. Работа изложена на 145 страницах, содержит 4 таблицы и 25 рисунков.

**Благодарности.** Автор благодарит Тамкович С.Н., Брызгунову О.Е., Челобанова Б.П., Седых С.Е. за предоставление образцов экзосом, Еремину А.В. – за помощь в сборе материала, проведении экспериментов со слезной жидкостью, а также добровольных доноров слезной жидкости.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН №5 «Фундаментальные науки – медицине», проект № 35, 2013-2015 гг. Номер государственной регистрации 01201363418.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Образцы слезной жидкости.** Слезоотделение стимулировали внесением в конъюнктивальный мешок 2-3 мг порошка альбуцида (сульфацетамид натрия моногидрат, DOSFARM, Казахстан). Стерильным хирургическим капилляром выделяющуюся слезную жидкость (СЖ) собирали из нижнего конъюнктивального мешка в стерильную сухую пробирку. Сбор СЖ проводился врачом-офтальмологом МНТК "Микрохирургия глаза" Ереминой А.В., на исследования получено разрешение этического комитета МНТК, протокол №1 от 15.01.2013. СЖ у каждого человека собиралась однократно из одного глаза; у больных забор СЖ производился до хирургического вмешательства. Диагноз ставился в МНТК «Микрохирургия глаза» врачами-офтальмологами при первичном осмотре. Изучено 44 образца СЖ здоровых людей (40-60 лет, 23 женщины и 21 мужчина). Данный возрастной диапазон был выбран, поскольку в этом возрасте значительно повышается риск развития глаукомы и сахарного диабета. Всего было исследовано 33 образца СЖ больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) (45-60 лет, 22 женщины и 11 мужчин): 16 пациентов с начальной стадией ПОУГ (ПОУГ I), 10 – развитой (ПОУГ II) и 7 – далеко зашедшей (ПОУГ III). 21 образец СЖ больных диабетической ретинопатией (ДР) (45-60 лет, 13 женщин и 8 мужчин): 9 больных непролиферативной (НПДР) и 12 - пролиферативной ретинопатией (ПДР). Образцы СЖ центрифугировали при 20000g в течение 15 мин. Супернатанты СЖ изучали методом негативного контрастирования (НК), осадок - методом ультратонких срезов.

**Выделение экзосом из СЖ.** Супернатанты СЖ разводили 4 мл фосфатного буфера и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Фильтрат дважды центрифугировали

при 100 000g в течение 90 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 150 мкл фосфатного буфера, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С. Компоненты осадков, полученных на конечной стадии выделения, обозначены термином «препараты частиц».

**Иммуноцитохимическое выявление экзосом.** 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 в концентрации 100 мкг/мл, или 10 мкл CD81 в концентрации 20 мкг/мл, инкубировали 8 ч на шейкере Epan 358S и сорбировали на медные сетки, покрытые формваровой подложкой. Сетки промывали фосфатным буфером 2 мин. Для выявления первичных антител к CD63, CD24 и CD9 использовали наночастицы золота (НЧЗ) (12-15 нм), конъюгированные с белком А. Для CD81 - использовали НЧЗ (10-12 нм), конъюгированные с антителами кролика против IgG мыши. Сетки, на которые сорбированы везикулы, инкубировали 2 ч с конъюгатами НЧЗ во влажной камере при комнатной температуре, промывали фосфатным буфером 2 мин, контрастировали фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК) 10 сек и исследовали под электронным микроскопом.

**Выделение экзосом из биологических жидкостей.** Выделение экзосом из биологических жидкостей проводилось методом последовательных центрифугирований с различными модификациями (таблица 1 и 2). Экзосомы были выделены из плазмы крови, элюатов с поверхности лейкоцитов и эритроцитов, мочи, молока и кондиционированной культуральной среды (среда, собранная по завершении культивирования). Для обозначения компонентов осадков, полученных на конечной стадии выделения, использован термин «препараты частиц».

**Электронно-микроскопическое исследование.** 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 ФВК. Экспериментально подбирали режим контрастирования каждого типа образцов. Фиксированные 4-% раствором параформа осадки промывали культуральной средой, дофиксировали 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> в течение 1 ч, обезвоживали и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме EM UC7 (Leica, Германия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца и изучали в ЭМ Jem 1400 (Jeol,



Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Снимки получали с помощью цифровой камеры Veleta (Olympus Corporation, Япония).

**Статистическая обработка.** Для оценки структурного состава образцов СЖ использован следующий параметр: доля образцов = количество образцов, в которых присутствуют структуры / общее количество образцов в группе \* 100 %. Для оценки значимости различий использовали критерии Фишера и Стьюдента. Анализ данных проводился с помощью программы Statistica 8.0. Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования экзосом развиваются в двух основных направлениях: поиск диагностических маркеров заболеваний [Runz S. et al., 2007; Zumaquero E. et al., 2010], и использование экзосом при лечении заболеваний, как терапевтических агентов [Sun C. et al., 2010; Vader P. et al., 2014]. Успешное развитие этих исследований предполагает наличие эффективных способов выделения экзосом из биологических жидкостей. В данной работе экзосомы выделяли методом последовательных центрифугирований с модификациями, учитывающими особенности биологических жидкостей (таблица 1 и 2).

**Таблица 1.** Характеристика образцов частиц, выделенных из биологических жидкостей.

Биол. жидкость	Центрифугирование (g, мин)	Фильтр размер пор 100 нм	Центрифугирование 100 000 g	Везикулы	Микро-частицы	Частицы детрита	Другие структуры
Среда клеток MCF-7	800 g 10 мин, 17000 g 20 мин	+	двойное	+	+	нет	нет
Среда клеток MDCK	800 g 10 мин, 17000 g 20 мин	+	двойное	+	+	+	нет
Кровь	1200 g 20 мин, 17000 g 15 мин	+	тройное	+	+	+	нет
Моча	17000 g 15 мин	+	двойное	+	+	+	Вирусоподобные червеобразные структуры

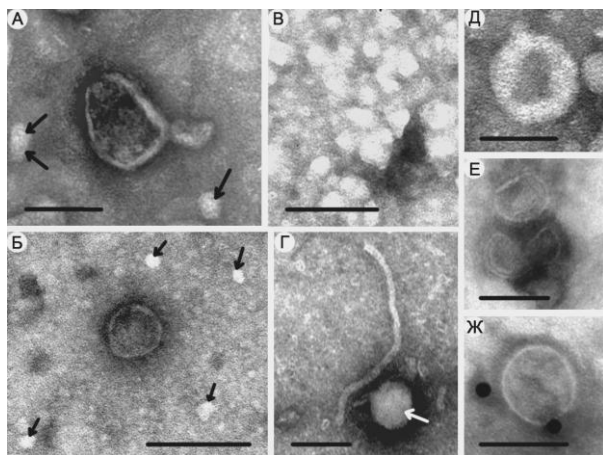
**Таблица 2.** Характеристика образцов частиц, выделенных из молока кобыл. Образцы предварительно центрифугировали при 500 g 30 мин и дважды при 16500 g 40 мин.

Фильтр размер пор 100 нм	Центрифугирование 100 000 g	Удаление белка	Гель-фильтрация	Везикулы	Микро-частицы	Частицы детрита	Другие структуры
нет	двойное	нет	нет	+	+	нет	рыхлые глобулярные структуры везикулы >100 нм
нет	двойное	да	нет	+	+	нет	рыхлые глобулярные структуры везикулы >100 нм
нет	двойное	нет	да	+	+	нет	везикулы >100 нм
+	двойное	нет	да	+	+	нет	нет

Полученные методом последовательных центрифугирований препараты многими авторами называются «экзосомы» [Thery C. et al., 2006], несмотря на то, что они содержат и другие структуры [Lotvall J. et al., 2014]. Наличие в препаратах «неэкзосомальных» структур необходимо принимать во внимание для корректной интерпретации полученных данных, именно поэтому изучение таких препаратов требует привлечения ЭМ, позволяющей прямо визуализировать все компоненты препаратов и оценивать наличие примесей.

Проведенное нами исследование методом НК показало, что все препараты, выделенные из разных биологических жидкостей, содержат везикулы, имеющие морфологические и молекулярные признаки экзосом: округлую чашеобразную форму, размер 40-100 нм, тетраспанины (CD63, CD9, CD81) на поверхности (рис. 1). Также во всех препаратах присутствуют структуры, не имеющие ограничивающей мембраны: микрочастицы (компактные агрегаты белка с четкими границами), размером 20-40 нм, низкой или средней электронной плотности (рис. 1). Препараты частиц, выделенные из крови, содержат также белки плазмы и частицы детрита, препараты частиц мочи - червеобразные и вирусоподобные структуры, препараты частиц молока - рыхлые глобулярные структуры (рис. 1). «Неэкзосомальные» структуры могут составлять значительную долю препаратов, что ставит под вопрос однозначность данных о содержании в экзосомах тех или иных молекул. Однако, большей частью исследователей

игнорируется тот факт, что препараты, называемые "экзосомы", помимо везикул содержат компоненты, не имеющие мембраны. В настоящее время существует единственный метод, - электронная микроскопия, позволяющий визуализировать компоненты препаратов, выделенных из биологических жидкостей и оценить долю тех или иных структур. Метод ЭМ позволяет оценить степень контаминации препаратов на всех стадиях очистки и установить, каким именно способом могут быть удалены те или иные компоненты исходных биологических жидкостей.

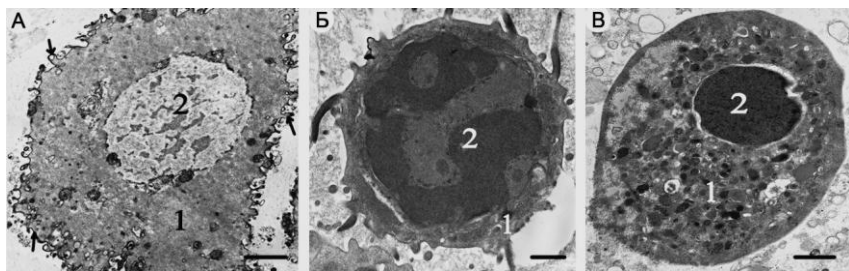


**Рисунок 1.** А, Б - общий вид препаратов частиц: А - выделенных из молока, Б - из плазмы. Черными стрелками показаны микрочастицы. В - белки плазмы. Г - червеобразная структура и частица детрита (показана стрелкой), выделенные из мочи. Д - рыхлая глобулярная структура молока. Е - везикулы 40-100 нм, выделенные из культуральной среды. Ж - везикула, выделенная из молока, положительная реакция с антителами к CD81. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

В естественном физиологическом состоянии (без слезоотделения) поверхность роговицы покрыта слезной пленкой, её слой, прилегающий к роговице, образован муцинами, которые выделяются бокаловидными клетками конъюнктивы и формируют трехмерную сеть, препятствующую контакту инородных предметов с роговицей [Cher I., 2012]. Средний слой пленки состоит из водного раствора белков и солей, выделяемых главными и добавочными слезными железами [Maitchouk D.Y. et al., 2000]. Внешний слой

пленки представлен липидами, которые продуцируются мейбомиевыми железами [Ohashi Y. et al., 2006] и предохраняют нижележащие слои от высыхания. Слезная пленка - динамичная постоянно обновляющаяся структура. Вопрос, какие компоненты слезной пленки попадают в СЖ при слезоотделении, не исследован. Предполагают, что секрет слезной железы при слезоотделении [Бржеский В.В. и соавт., 2014] попадает в собираемый образец вместе с компонентами слезной пленки. С помощью ЭМ мы исследовали образцы СЖ методом НК, который подходит для выявления структур (до 1 мкм), находящихся во взвешенном состоянии, и методом ультратонких срезов, позволяющим изучить нерастворимые в воде частицы.

Изучение ультратонких срезов осадков СЖ выявило эпителиоциты, нейтрофилы и лимфоциты (рис. 2). Доля образцов в каждой группе испытуемых, содержавших данные клетки, приведена в таблице 3. В образцах СЖ здоровых людей выявлено небольшое количество лейкоцитов, в основном нейтрофилов; в образцах СЖ больных ДР лейкоцитов было больше ( $p < 0,01$ , критерий Фишера). Известно, что развитие сахарного диабета ведет к усилению проницаемости кровеносных сосудов [Gerber A.L. et al., 2015], что сопровождается миграции лейкоцитов из их просвета. Следует отметить, что в образцах СЖ больных ПОУГ лейкоцитов и их фрагментов не обнаружено. Вероятно, течение ПОУГ сопровождается функциональными изменениями сосудов, приводящими к снижению миграции лейкоцитов.



**Рисунок 2.** Клетки СЖ: А - эпителиоцит, Б - лимфоцит, В - нейтрофил. 1 - цитоплазма, 2 - ядро. Длина масштабной линии соответствует 500 нм. Электронные микрофотографии, ультратонкие срезы.

На ультратонких срезах осадков СЖ обнаружены структуры, которые, очевидно, представляют собой компоненты слезной пленки, попадающие в СЖ при стимуляции слезоотделения (рис. 3 А, Б). Гранулы муцина бокаловидных клеток (0,5-1,5 мкм) содержали плотно упакованный

волокнистый материал, окружающая гранулу мембрана обычно была частично или полностью разрушена, высвобожденное содержимое формировало сеть волокон (рис. 3 Б). Доля образцов, содержащих гранулы бокаловидных клеток, в группе больных ПДР была заметно ниже по сравнению со здоровыми людьми и больными НПДР (таблица 3). Липидные структуры в виде полиморфных образований, состоящих из гомогенного вещества, в котором перемежались участки средней и низкой электронной плотности, очевидно, попадали в осадки СЖ вследствие смывания слезной пленки при слезоотделении.

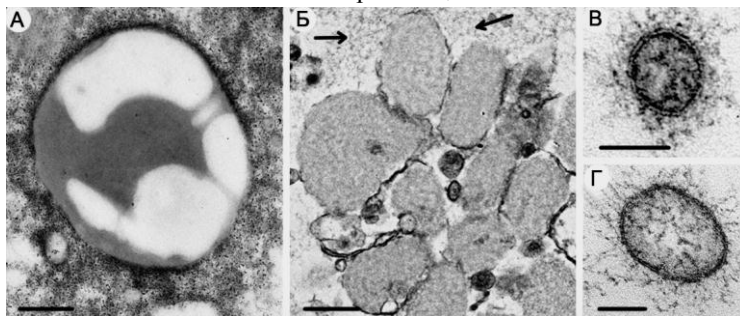
**Таблица 3.** Морфологические характеристики осадков СЖ (доля образцов (%), содержащих структурные компоненты СЖ).

	Кол-во образцов	Эпителиоциты	Лейкоциты	Гранулы бокаловидных клеток	Липиды слезной пленки	«Мохнатые» везикулы
Здоровые	29	31 %	24 %	72 %	72 %	20 %
Непролиферативная ДР	6	33 %	33 %	83 % ^	83 %	66 % *
Прролиферативная ДР	12	41 %	66 % **	41 % *	58 %	41 %
ПОУГ I	16	62 %	0 % *	62 %	81 %	62 % *
ПОУГ II	9	44 %	0 %	66 %	66 %	33 %
ПОУГ III	6	0 % &	0 %	83 %	66 %	33 %

Звездочкой (\*) обозначены значимые отличия (\*- $p < 0,05$ , \*\*- $p < 0,01$ , критерий Фишера) по сравнению со здоровыми. Каретом (^) – сравнение непролиферативной и пролиферативной ДР (\*- $p < 0,05$ , критерий Фишера). Амперсандом (&) - сравнение ПОУГ I и ПОУГ III (\*- $p < 0,05$ , критерий Фишера). ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома, ДР – диабетическая ретинопатия.

На срезах осадков СЖ обнаружены многочисленные везикулы. Среди них отчетливо выделялись округлые везикулы размером 150 - 300 нм, на поверхности которых присутствовали длинные волокна, пронзающие мембрану насквозь (рис. 3 В, Г), что указывает на наличие белкового трансмембранного домена. Наружные части волокон могли достигать в длину 150 нм, внутренние взаимодействовали друг с другом и образовывали внутри везикулы сеть. Анализ ультратонких срезов позволил заключить, что «мохнатые» везикулы представляют собой отшнуровавшиеся участки

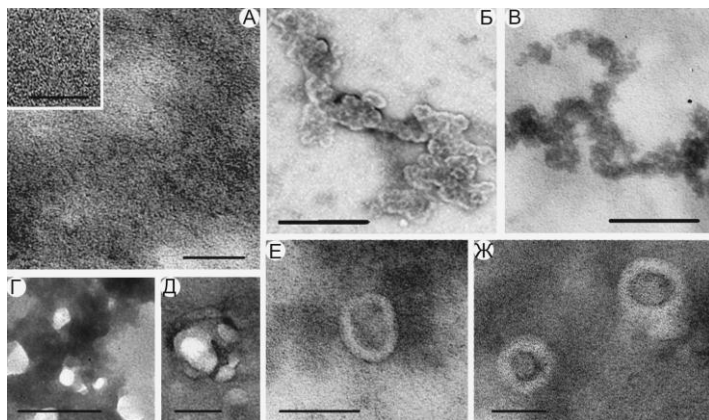
цитоплазматических выростов и/или микроворсинок эпителиальных клеток. В работе Nichols с соавт. сходные структуры описаны как поперечные срезы микроворсинок клеток эпителия конъюнктивы [Nichols В.А. et al, 1983]. Среди больных на ранних стадиях ПОУГ и ДР доля образцов, содержащих «мохнатые» везикулы, намного превышает таковую у здоровых людей (таблица 3). Причины, по которым эпителиальные клетки формируют данные везикулы, не ясны, однако, увеличение их количества при патологических состояниях, по-видимому, отражает деструктивные изменения эпителиальных клеток роговицы или конъюнктивы.



**Рисунок 3.** Субклеточные структуры СЖ: А - липидное образование, Б – гранулы муцина и волокнистый материал (показан стрелкой), В-Г - "мохнатые" везикулы. Длина масштабной линии соответствует: А, В, Г - 100 нм, Б - 1 мкм. Электронные микрофотографии, ультратонкие срезы.

Макромолекулярные агрегаты (ММА), выявляемые в супернатантах СЖ методом НК, представляли собой длинные разветвленные цепочки, состоящие из субъединиц, и по морфологии разделялись на три основных типа. Агрегаты первого типа сформированы колечками размером 10 нм (рис. 4 А), второго типа - полиморфными колечками 15 нм, которые частично сливались друг с другом (рис. 4 Б), а агрегаты третьего типа - шариками размером 30 нм с нечеткими границами (рис. 4 В). Макромолекулярные агрегаты всех типов часто контактировали с везикулами и микрочастицами, формируя вокруг них своеобразный «кокон». Ультраструктурный анализ супернатантов слезной жидкости показал, что агрегаты первого типа, присутствуют в 80% образцов здоровых людей, очевидно, что они соответствуют одному из мажорных белков СЖ. Макромолекулярные агрегаты второго и третьего типа у здоровых людей встречались реже. При развитии ДР и ПОУГ встречаемость ММА разных типов меняется, в группе

больных ДР возрастает доля образцов, содержащих ММА 3 типа, в группе больных ПОУГ – ММА 2 типа.

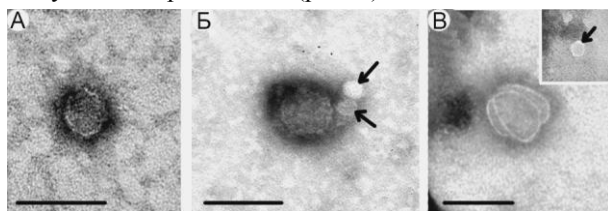


**Рисунок 4.** Компоненты супернатантов СЖ. А – макромолекулярные агрегаты (ММА) 1 типа. Б – ММА 2 типа. В – ММА 3 типа. Г – микроагрегаты. Д – частицы детрита. Е – везикула 40-100 нм. Ж – везикула с «капсулой». Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование уранилацетатом.

Другим компонентом супернатантов СЖ являются частицы - везикулы, микроагрегаты и частицы детрита (рис. 4). Везикулы ограничены мембраной, их размер 40-300 нм, форма - округлая или чашеобразная. Во всех исследованных образцах отмечены везикулы округлой чашеобразной формы размером 40-100 нм (рис.4 Е), по морфологическим характеристикам соответствующие экзосомам, описанным в научной литературе при ЭМ исследованиях образцов, выделенных из других биологических жидкостей. Микроагрегаты слезной жидкости представляют собой компактные агрегаты размером 20-40 нм с четкой границей (рис. 4 Г). Частицы детрита выявлялись в виде бесформенных структур средней электронной плотности, размером 40-300 нм, с однородной или зернистой структурой (рис. 4 Д). Отличительной чертой образцов больных пролиферативной ДР и далеко зашедшей ПОУГ были везикулы, окруженные «капсулой» (рис. 4 Ж).

Экзосомы из СЖ выделялись нами впервые, на основе опыта изучения других биологических жидкостей. ЭМ анализ полученных образцов показал, что ультрафильтрация и ультрацентрифугирование обеспечивают полное удаление частиц крупнее 100 нм и ММА, содержащихся в супернатантах СЖ.

Все полученные образцы и здоровых людей, и больных ДР и ПОУГ содержали везикулы и микрочастицы (рис. 5).



**Рисунок 5.** Компоненты препаратов частиц, выделенных из СЖ: везикулы и микрочастицы (показаны стрелками). Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

Свойства СЖ позволяют визуализировать экзосомы в нативном препарате, что невозможно в случае других биологических жидкостей. Это даёт возможность сравнить морфологию экзосом до и после выделения. Морфология экзосом и микрочастиц идентична в супернатантах и препаратах, полученных путем последовательных центрифугирований, что указывает на отсутствие повреждающего действия этих процедур.

**Заключение.** Результаты данной работы свидетельствуют, что ультраструктурные характеристики компонентов СЖ изменяются при развитии ДР и ПОУГ, причем эти изменения заметны уже на ранних стадиях заболеваний и усиливаются к поздним. Таким образом, СЖ может быть использована в качестве субстрата для оценки состояния структур глаза.

## 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 чаще встречаются лейкоциты, 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 препаратов 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 препараты частиц содержат структуры, не имеющие мембраны (микрочастицы), что указывает на необходимость электронно-микроскопического изучения любых образцов, предназначенных для молекулярно-биологических исследований экзосом.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка ВАК:

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

5. Bryzgunova O.E., Zariпов 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; 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, Научоград 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, Научоград 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. международным участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-2015», 5-9 октября, 2015, Новосибирск, Россия, ISBN 978-5-4437-0443-2 С. 123

**Список сокращений.** СЖ – слезная жидкость, ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома, ДР – диабетическая ретинопатия, ЭМ – электронная микроскопия, НЧЗ – наночастицы золота, НК – негативное контрастирование.

Подписано в печать 18.07.2015.

Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Отпечатано в полиграфической компании "Алекпресс"  
630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 6/1