

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 96 – 105

Z. S. Kachiyeva^{1,2}, S. M. Nurmoldin², N. O. Nakisbekov²

¹Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan,

²Asfendiyarov Kazakh national medical university, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: kachieva@gmail.com

**ROLE OF DKK1 GENE POLYMORPHISMS
IN DEVELOPING OF JOINT DEGRADATION
IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

Abstract. The protein spectra and micro RNAs of exosomes were studied in patients with the following diseases: rheumatoid arthritis, breast cancer, myocardial infarction and osteoporosis.

We have characterized the spectra of micro RNA proteins in the exosomes of patients with sociologically significant types of diseases. In the course of the project, we found minor differences in the spectrum of micro RNA and proteins (peptides) of exosomes, which provides the basis for a deeper study in this area. The study found minor differences between various diseases and the control group, which requires further proteomic and transcriptomic studies of these diseases among the local population to create a diagnostic database in the definition of these diseases.

Key words: exosomes, rheumatoid arthritis, osteoporosis, micro RNA, breast cancer, myocardial infarction.

З. С. Качиева^{1,2}, Ш. М. Нурмолдин², Н. О. Накисбеков²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,

²Казахский национальный медицинский университет им. С. Ж. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКОВОГО СОСТАВА
И СПЕКТРА МИКРО РНК ЭКЗОСОМ В КРОВИ БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ,
ИНФАРКТОМ МИОКАРДА И ОСТЕОПОРОЗОМ**

Аннотация. Были изучены спектры белков и микро РНК экзосом больных следующими заболеваниями: ревматоидный артрит, рак молочной железы, инфаркт миокарда и остеопороз.

Нами были охарактеризованы спектры белков микро РНК в экзосомах больных социологически значимыми типами заболеваний. В ходе выполнения проекта нами были обнаружены незначительные различия в спектре микро РНК и белков (пептидов) экзосом, что даёт основу для проведения более глубокого исследования в этой области. В ходе исследования обнаружены незначительные различия между различными заболеваниями и контрольной группой, что требует дальнейшего проведения протеомных и транскриптомных исследований данных заболеваний среди местной популяции для создания диагностической базы данных в определении указанных болезней.

Ключевые слова: экзосомы, ревматоидный артрит, остеопороз, микро РНК, рак молочной железы, инфаркт миокарда.

Введение. Экзосомы – небольшие сферы (обычно размером от 40 до 100 нм). Первоначально они образуются внутри клетки – почкуются в полость, называемую эндосомой. Экзосомы обнаружены в самых разных полостных жидкостях организма, а также в моче, сперме, сыворотке крови, лимфе, слюне, слезах, выделениях из носа, желчи, околоплодных водах и даже в грудном

молоке. Производить экзосомы способны почти любые клетки – от клеток желудочно-кишечного тракта и желез внутренней секреции до клеток кожи и мозга. Экзосомы способны переносить белки и нуклеиновые кислоты и таким образом участвуют в регуляции различных процессов происходящих в организме. Спектр белков и микро РНК в составе экзосом зависит от состояния организма. При различных заболеваниях он различен. Знание специфического состава белков и нуклеиновых кислот позволяет использовать экзосомы в качестве диагностического маркера. Основной методологией исследования является: - характеристика спектра белков методами одномерного и двухмерного электрофореза, и - характеристика спектра микро РНК путём определения первичной нуклеотидной последовательности с помощью метода параллельного массивного секвенирования (NGS) входящих в состав экзосом. В результате ожидается выявление различий в спектрах белков и микро РНК в составе экзосом при различных заболеваниях. Полученные данные могут быть использованы в медицине после валидации как диагностические маркеры при соответствующих заболеваниях.

Истоками в истории исследования субклеточных структур являются работы, посвящённые изучению феномена экстраклеточных нуклеиновых кислот. Одними из пионерских работ в данном направлении в восьмидесятих годах двадцатого столетия являются работы Leon S.A., Shapiro B. с соавторами [1, 2]. Авторами проведён количественный анализ содержания внеклеточной ДНК у здоровых и больных воспалительными заболеваниями и злокачественными опухолями. Показан достоверно более высокий уровень содержания ДНК у больных неоплазиями желудочно-кишечного тракта. В обсуждении работы авторы ставят вопрос о тканевых источниках экстраклеточной ДНК и отмечают, что источником внеклеточной ДНК может служить как прижизненный спонтанный выброс ДНК лимфоцитами [3], так и массивная клеточная гибель, наблюдающаяся при таких состояниях, как аутоиммунные заболевания, тромбоэмболия лёгочной артерии и злокачественные опухоли. В многочисленных обзорах и монографиях, посвящённых феномену программированной клеточной гибели, наиболее интересному, с моей точки зрения, явлению, а именно – судьбе апоптотических телец посвящена одна фраза. Она гласит, что апоптотические тельца фагоцитируются макрофагами и соседними клетками [4, 5, 6]. Многие исследователи долгое время скептически относились к факту обнаружения внеклеточных нуклеиновых кислот в сыворотке, плазме крови и других секретах организма. Их главным контраргументом было высказывание о том, что свободные нуклеиновые кислоты должны деградировать в среде, богатой ДНК-азами и РНК-азами, которой является плазма крови. Обнаружение факта упаковки нуклеиновых кислот в мембрану, защищающую их от воздействия нуклеаз, явилось неоспоримым контраргументом в споре со скептиками. Изящный эксперимент *in vitro* продемонстрировал, что нуклеиновые кислоты, помещённые в нуклеосомы, не деградируют в среде с нуклеазами, в то время как свободные нуклеиновые кислоты подвергаются деградации [7]. Пути преодоления ещё одного из противоречий, возникших при изучении внеклеточных нуклеиновых кислот, наметились в последнее время. Противоречие касается несоизмеримости массы, темпов клеточного обновления нормальных и опухолевых структур и концентрации экстрацеллюлярных нуклеиновых кислот в норме и при опухолевом росте. Предполагают, что это несоответствие связано с дефектами системы деградации протеинов при различных состояниях организма, что заставляет клетки избавляться от функционально отработанного генетического и белкового груза посредством секреции экзосом или нуклеосом. Процессы внутриклеточного протеолиза представлены двумя основными путями: лизосомальным и нелизосомальным. Лизосомальная система разрушает белки, связанные с мембранами, в то время как нелизосомальная система (кальпаиновая и убиквитиновая) расщепляет аномальные и регуляторные короткоживущие белки (циклины, P53 и др.). Мутации в системах белкового протеолиза характерны для опухолевого процесса [8].

Структура и состав экзосом. Экзосомы представляют собой шарообразные структуры, размером от 40 до 100 нм [9], наружный слой которых составляет мембрана. Мембрана представляет собой билипидную оболочку, в промежутке которой содержатся структурные белковые и нуклеиновые компоненты цитозоля [10]. Везикулы, содержащиеся внутри полости мультивезикулярных эндосом, перегружаются затем в лизосомы и перевариваются или выделяются как экзосомы в межклеточное пространство. Механизм сортировки мембран в различных популяциях внутримембранных везикул непонятен. Содержимое везикула отделяется от субдоменовэндо-

сомальной мембраны и транспортируется в полость эндосомы. Для этого процесса требуется сфинголипидцерамид. Процесс высвобождения экзосом редуцируется при ингибировании сфингомиелиназ [11]. Биологическая функция экзосом обширна и разнообразна: они принимают участие в презентации антигена в иммунном ответе, передают от клетки к клетке белки и нуклеиновые кислоты, в том числе РНК и микро РНК [9]. Межклеточный обмен экзосомами позволяет осуществить передачу новых свойств всем членам тканевого и органного сообщества [10]. Таким образом, осуществляется горизонтальный перенос генетической информации между клетками.

Например: P53 является одним из ключевых протеинов, поддерживающих клеточный гомеостаз, предотвращая накопление мутаций в геноме. P53 активируется различными стрессовыми сигналами. Было продемонстрировано, что P53 регулирует транскрипцию генов TSAP6 и CHMP4C, которые повышают продукцию экзосом, а также CAV1 и CHMP4C, продукты которых способствуют более быстрому эндосомальному клиренсу эпидермального фактора роста с цитоплазматической мембраны. Каждая из этих P53 зависимых эндосомальных функций замедляет клеточный рост и развитие, обеспечивает передачу стрессового сигнала посредством экзосом в клеточном сообществе [12].

Интересный аспект участия экзосом в функционировании нервной ткани представлен в работе Smalheiser N.R. [13]. Не исключено, что обмен экзосомами играет важную роль в процессах формирования памяти и улучшает функцию гематоэнцефалического барьера, ограждая антигенную информацию нейронов от воздействия иммунной системы, способной воспринимать ее в качестве чужеродной.

Продemonстрировано, что РНК, несущие экзосомы, являясь результатом гибели опухолевых клеток при колоректальном раке, способствуют усилению пролиферации нормальных эндотелиальных клеток [14]. Не исключено, что таким образом реализуется защитное действие неопластически изменённых клеток на нормальные ткани макроорганизма при длительных, стрессиндуцирующих воздействиях внешней среды. Неопластически изменённые клетки позволяют макроорганизму благополучно дожить до клинической манифестации рака, а это – годы и десятилетия, поддерживая ткань в условиях пролиферации.

Экзосомы, полученные из клеток мезотелиомы, содержат протеины главного комплекса гистосовместимости I класса в ассоциации с белками теплового шока (HSP70 and HSP90). Микро-везикулы также содержат белки цитоскелета и киназо-подобные протеины. Обнаружены в экзосомах и ангиогенные факторы, способствующие развитию сосудов в опухолевом микро-окружении. Таким образом, клетки мезотелиомы вырабатывают экзосомы, содержащие протеины, необходимые для процессов антигенной презентации, межклеточной передачи сигналов, миграции и адгезии [15].

Экзосомы регистрируются в различных биологических секретах и межтканевых жидкостях макроорганизма, таких как слюна, бронхиальный секрет, асцитическая и амниотическая жидкость, кровь, грудное молоко, синовиальное содержимое, моча. Представляет значительный интерес исследование и использование экзосом в плане диагностики при различных заболеваниях и таргетной терапии [9].

По данным Nilsson J с соавт., регистрация PCA-3 и химерных генов TMPRSS2:ERG, являющихся результатом транслокации, в экзосомах мочи больных раком простаты делает привлекательным использование данного теста для диагностики и мониторинга статуса пациента [16]. Специфичность в когорте скрининга составляет 90% [17].

Экзосомы плазмы больных раком яичников, экспрессирующие Claudin-4, были использованы в пилотном исследовании с целью разработки неинвазивного метода диагностики данной патологии. При специфичности 98%, claudin-4 тест демонстрировал чувствительность 51% [18].

При исследовании экзосом у больных раком лёгкого и здоровых добровольцев выявлена достоверная разница как в концентрации экзосом (2,85 мг/мл против 0,77 мг/мл), так и уровне микроРНК в них (158,6 нг/мл против 68,1 нг/мл) между когортами обследованных при уровне ошибки в 5% [19].

Экзосомы, вырабатываемые глиальными опухолями мозга, способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и регистрируются в сыворотке крови больных данной патологией. По

биохимическим и биофизическим характеристикам они не отличаются от экзосом, вырабатываемых другими типами клеток, и содержат такие факторы роста, как EGFR, EGFRvIII и TGF-бета [20].

Экзосомы, продуцируемые глиобластомами, содержат mRNA, miRNA и ангиогенные протеины. Они способны инкорпорироваться в клетки-реципиенты и передавать им информацию опухолевой природы, создавая благоприятное для опухолевого роста микроокружение. Экзосомы также стимулируют пролиферацию в клеточных линиях глиомы *in vitro*. Опухоль, ассоциированный EGFRvIII, регистрируется в экзосомах сыворотки крови части больных (7 из 25) [21].

Экзосомы стимулируют экспрессию mRNA ангиогенных факторов, таких как MMP-9, фактор роста эндотелия сосудов. Совместное внутривенное введение экзосом и опухолевых клеток мышам в сингенной модели демонстрировало большее количество метастатических фокусов в лёгких и костном мозге по сравнению с контрольными животными. Экзосомы играют важную роль в процессах опухолевой прогрессии и метастазировании при раке лёгкого [22].

Есть серьёзные основания полагать, что количественная и качественная характеристика микрочастиц, продуцируемых клетками различных тканей в норме и при патологии, может дать существенную диагностическую и прогностическую информацию и служить биомаркером различных заболеваний.

Материалы и методы. Для выделения экзосом из плазмы пациентов *Total exosome isolation kit (from plasma)* (Life Technologies, USA); для выделения белков и микроРНК *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen™ USA); секвенирование микро РНК *TruSeq Small RNA Library Preparation Kits* (Illumina, Inc., USA); для проведения одномерного электрофореза *Acrylamide, N,N-methylene-bisacrylamide, TrisHCl, Glycine, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), PSA (Ammonium persulfate), β -mercaptoethanol, Glycerol, Bromophenolblue, SDS (sodium dodecyl sulfate)* Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany; для двумерного электрофореза *Urea* Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany, *CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), Serva IPG Blue Strips p H3-10, DTT (1,4-Dithiothreitol), IAA (Iodoacetamide), carrier ampholytes (SERVALYT)* SERVAElectrophoresis GmbH, Germany, *milliQ H₂O*; для окраски гелей *Ethanol, Perchloric acid, Pierce® Color Silver Stain Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, USA) необходимое оборудование *BioRad Electrophoresis supply* (BioRad Inc., USA), *IEF100* (Hofer, Inc. USA), секвенирование на *MiSeq Illumina* (Illumina, Inc., USA).

Подбор образцов и выделение экзосом. Были отобраны следующие образцы:

- 1) Пациенты с диагнозом инфаркт миокарда (ИМ);
- 2) Пациенты с диагнозом ревматоидный артрит (F);
- 3) Пациенты с диагнозом остеопороз (DKK);
- 4) Пациенты с диагнозом рак молочной железы (BRCA).
- 5) 8 контрольных образцов, взятых у сотрудников лаборатории в возрасте от 23 до 28 лет.

Для выделения экзосом из плазмы пациентов использовался набор *Total exosome isolation kit (from plasma)* (Life Technologies, USA); для выделения белков и микро РНК экзосом использовался набор *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen™ USA). Все процедуры были проведены согласно указаниям производителей.

Проведение электрофореза. Для проведения одномерного и двумерного электрофорезов производится измерение концентрации белков в выделенных экзосомах, после чего проводится вертикальный ДСН-ПААГ электрофорез белков по *Laemmli, 1970* [23]. Результаты приведены на рисунке 1.

Изоэлектрофокусирование белков проводилось по методу *O'Farrell, 1975* [24]. Готовые полоски с градиентным показателем pH наносятся как образец вместе с регидратирующим буфером. Оставляем в камере на регидратацию на 15 часов, после чего переносим в аппарат для изоэлектрофокусирования и ставим на 15 часов на градиентное электрическое поле, по программе на 12 см полоску. После чего извлекаем полоску геля, уравниваем для того, чтобы сделать второе направление электрофореза. Ставим на вертикальное направление по вышеописанному методу. После завершения электрофореза гели фиксируются раствором 4% перхлорной кислоты в 70% спирте, затем проводится окраска гелей с помощью серебра.

Секвенирование микро РНК проводилось на секвенаторе нового поколения *IlluminaMiSeq*. Подготовка библиотеки для секвенирования проводится по описанному методу в наборе *TruSeqsmallRNAkit*.

Результаты и обсуждение

При планировании данного эксперимента перед нами ставились цели определения различия в белковом и микро РНК-вом составе экзосом при 4-х видах заболеваний. Данные, полученные в ходе исследований, доказывают явное различие в спектре белков, что требует дальнейшего протеомного анализа полученных данных. Ниже мы приводим некоторые изображения полученных данных.

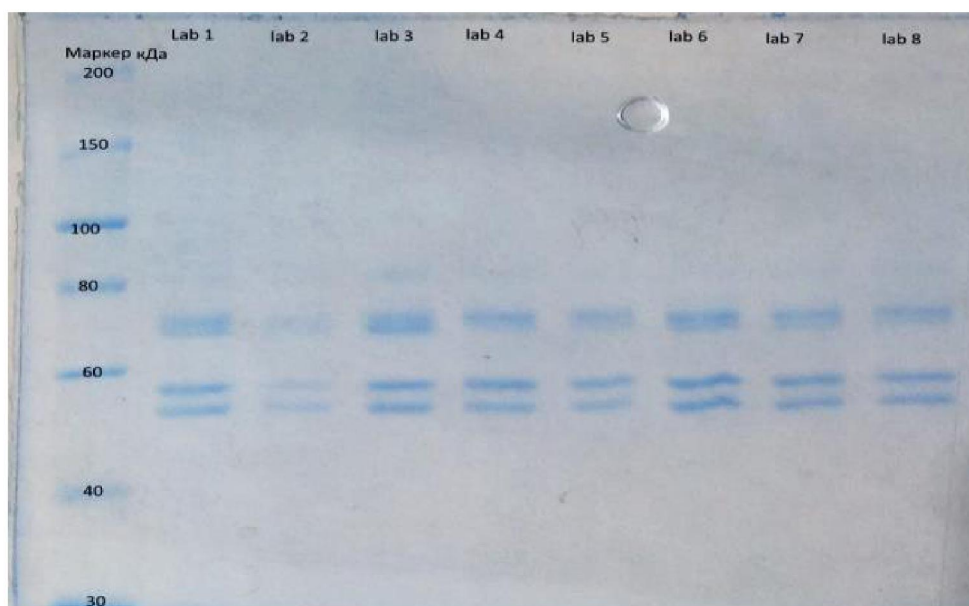


Рисунок 1 – Гель-электрофореграмма 8-ми контрольных образцов

Были выделены экзосомы из 20 образцов отобранных для исследований. Результаты приведены в рисунках 2 и 3.

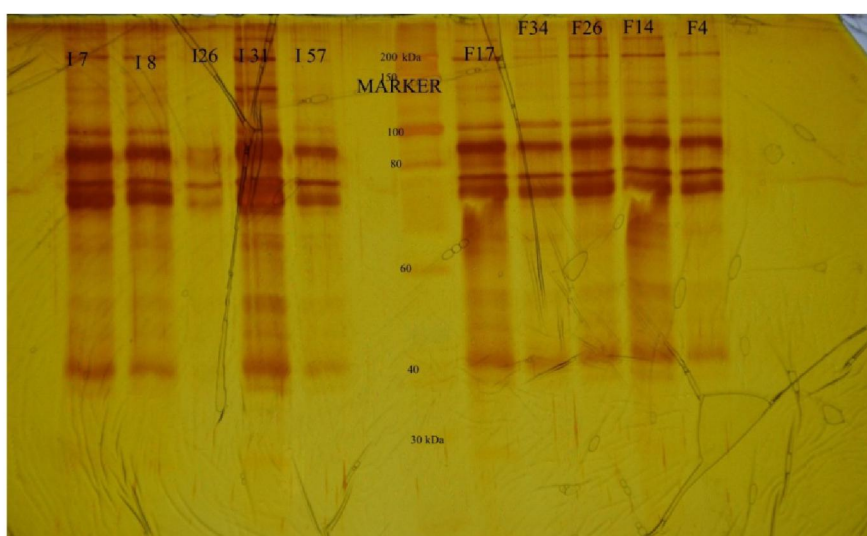


Рисунок 2 – Гель-электрофореграмма образцов ИМ и Ревматоидный артрит

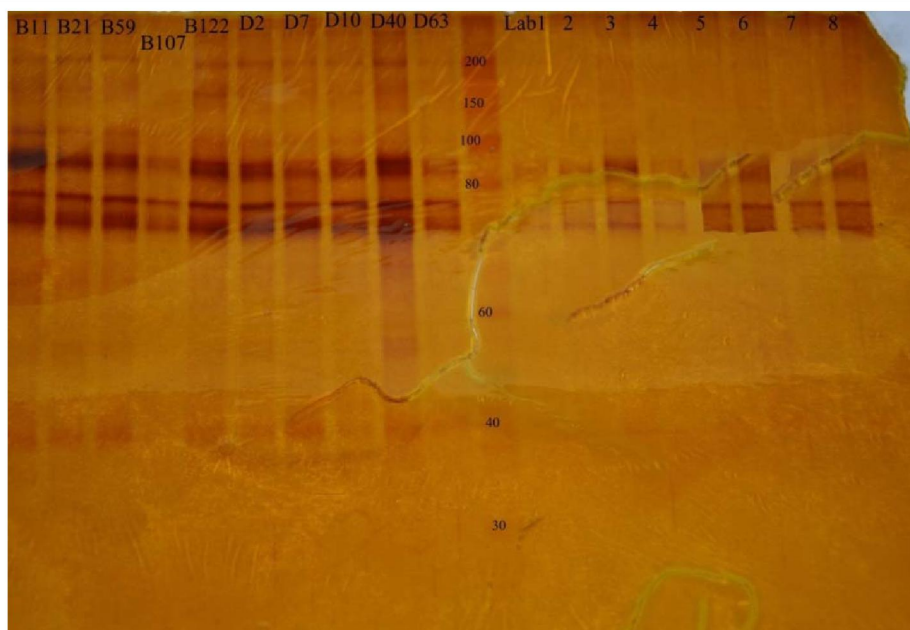


Рисунок 3 – Гель-электрофореграмма образцов BRCA, DKK и контроля Lab 1-8

Для проведения изоэлектрофокусирования образцы наносились вместе с регидратирующим буфером, описанным *Görg, A., Postel, W., 1988* в полоски геля для первого направления IPG Blue Strip [25]. Фокусирование проводилось на аппарате для двумерного электрофореза фирмы *HoferIEF 100*. Был отработан метод для запуска изоэлектрофокусирования. Полученный результат показан на рисунке 4.

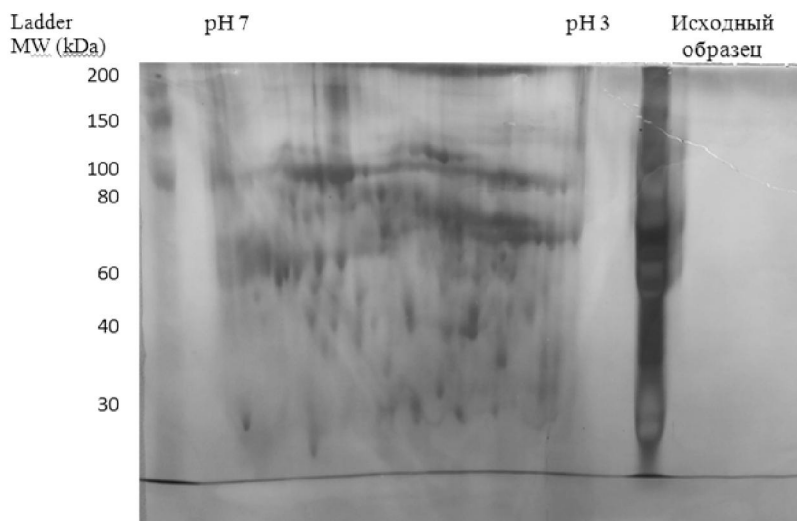


Рисунок 4 – 2D электрофорез контрольного образца

После проведения двумерного электрофореза остальных образцов мы выделили основные отличающиеся по спектру картины. Примеры показаны на рисунках 5 и 6.

На рисунках 3 и 4 показаны различия в спектре белков по массам между группами и с контрольными образцами. При различных заболеваниях спектр белков по массам значительно увеличивается, что может указывать на разрушение клеток или же увеличение уровня межклеточной сигнальной активности. Альбумин в плазме содержится в больших количествах, также мы можем видеть разные формы альбумина в экзосомах на уровне 65 кДа в больших количествах. Это свидетельствует о переносе альбумина с помощью экзосом, чтобы не нарушать кислотно-щелоч-

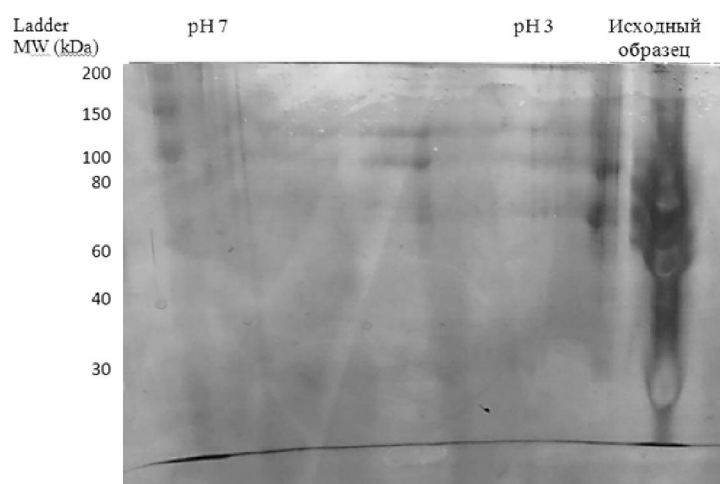


Рисунок 5 – Разделение белковэкзосом у пациентов с диагнозом инфаркт миокарда

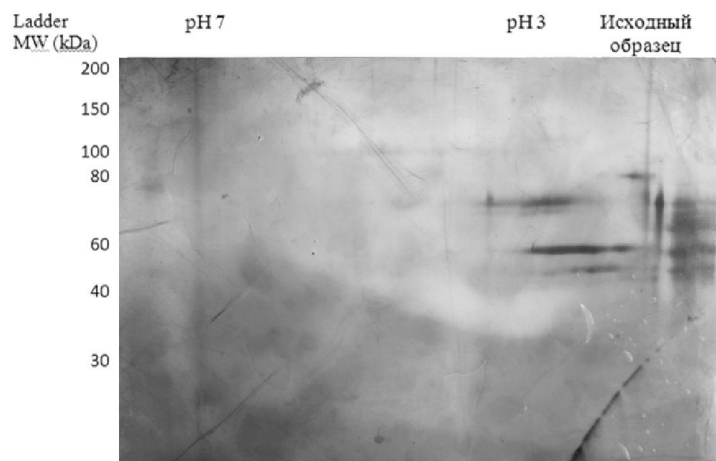
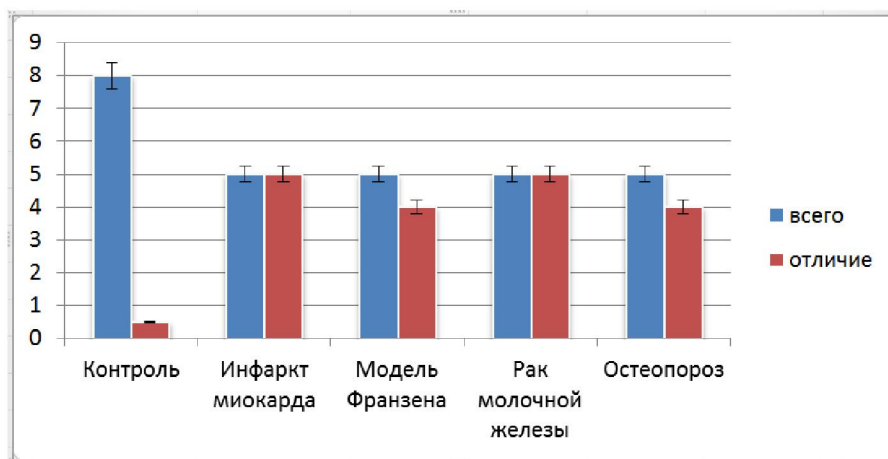


Рисунок 6 – Разделение белков экзосом у пациентов с диагнозом остеопороз

ной баланс (гомеостаз) крови. Один из выводов о спектре белка может говорить о роли и активности экзосом при различных заболеваниях. На рисунках с 6-го по 8 мы видим явно отличающиеся различия в спектре белков. В основном получается, что при обычном случае экзосомы переносят белки с разными водородными показателями, а при различных патологиях переносят в основном кислые белки. Данные после всех визуальных сравнений приведены на диаграмме.



Разница в спектре белков экзосом пациентов с различными диагнозами и контрольной группы

Как мы можем видеть, в сравнении внутригрупповой и общей картины мы получаем графическое изображение на сколько отличаются выбранные пациенты от контрольной группы. Мы не можем с точностью утверждать о диагностическом значении, так как это требует более детального изучения вопроса и нескольких повторений анализа. Но мы можем предположить о значимости полученных данных при характеристике заболеваний. Получается, что различия в спектрах описаны по сравнению с контрольной группой. При обработке данных двумерного электрофореза необходим аппарат, позволяющий находить и вырезать необходимые участки для дальнейшего определения белка методом масс-спектрометрии и биоинформатической обработкой данных для определения названия. Данное исследование положило начало для дальнейшего фундаментального исследования роли экзосом в человеческом организме и его гомеостазе. Роль микро РНК в защитной функции организма немаловажна. При обнаружении организмом вирусной инфекционной частицы или же при инфицировании, защите необходимо оповестить остальные клетки иммунитета о проникновении, выделяя тем самым сигнальные молекулы микро РНК с характеристиками инфекции, своего рода фоторобот, он оповещает и подготавливает и соседние клетки на защиту. В организме свободные микро РНК быстро разрушаются с помощью внеклеточных нуклеаз, поэтому экзосомы служат защитой от их действия, выполняя роль межклеточной связи и передачи информации. Вышеописанные заболевания в основном кроме инфаркта миокарда являются пре- и проинфекционными, аутоиммунными заболеваниями, некоторые даже передающиеся наследственным образом. Спектр микро РНК при данных заболеваниях не отличается в сравнительно большой степени. Полученные данные проходят необходимую биоинформатическую и статистическую обработку для выяснения значимости в спектре микро РНК экзосом плазмы при данных заболеваниях. Но мы смело можем предположить, что различия должны иметь место, так как при этих видах заболеваний организму необходимы сигнальные пути и даже при разрушении клеток и тканей происходит выделение экзосом в гуморальную жидкость организма. И чтобы различного рода ферменты и активные внутриклеточные вещества не причиняли вреда остальным клеткам необходима защита, тем самым погибающие клетки выпускают сигнальные экзосомы, предупреждают остальные клетки или ликвидируют их.

Выводы. При изучении спектра белков и микро РНК экзосом выделенных из плазмы мы получаем визуальную картину различия спектров и тем самым показываем важную роль экзосом при различных видах заболеваний. Так как экзосомы являются межклеточными переносчиками информации и играют важную роль в регулировании межклеточной трансляции сигналов. Целью нашего исследования являлось показать различия в спектре белков и микро РНК экзосом при различных патологиях. Нам удалось определить немаловажные различия в спектре белков с помощью одномерного и двумерного электрофореза и сиквенса микро РНК. При различных видах заболеваний клетки организма разрушаются или транслируют информацию на уровне ранней ответной реакции организма, секретируя экзосомы при разрушении или информировании соседних клеток. Выделяя плазменные экзосомы, мы получили первичные показатели изменения уровня и разницы спектра белков в них. Полученные данные показывают значимость проведенной работы, тем самым дают возможность для продолжения данных исследований в более подробной форме, охватывая и другие социально значимые заболевания. Данное исследование проводилось впервые на территории Казахстана, что позволяет с гордостью говорить о новизне проведенных испытаний и о необходимости продолжения данной работы. Получена первоначальная информация о разности в спектрах при различных заболеваниях, что требует более подробного, фундаментального исследования данного вопроса. Таким образом, мы выясним немаловажную роль экзосом при транслировании информации, сохранения гомеостаза и выполнении защитной функции организма.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Leon S.A., Shapiro B., Servi P., Parsons R.G. A comparison of DNA and DNA-binding protein levels in malignant disease // Eur. J Cancer 1981; 17:533-538
- [2] Shapiro B., Chakraborty M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease. Cancer 1983; 51:2116-2120
- [3] Ancer P., Stroun M., Maurice P.A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes in vitro // Cancer Res. 1975; 35:2375-2378

- [4] Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н. Апоптоз и его роль в атерогенезе // Медицинский академический журнал. 2003; 3(4): 3-19.
- [5] Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., Колесникова Н.В., Славянская Т.А., Ломтатидзе Л.В. Апоптоз в иммунологических процессах // Аллергология и иммунология, 2000; 1(1): 15-23.
- [6] Сорока Н.Ф., Свирновский А.И., Рекун А.Л. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой: патогенетические и клинические аспекты // Научно-практическая ревматология, 2006; 4: 44-52
- [7] Hasselmann D.O, Rappl G., Tilgen W. et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clinical Chemistry*. 2001; 47, (8):1488-1489
- [8] Спирина Л.В., Кондакова И.В. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе // Вопросы онкологии. 2008; 54(6): 690-694.
- [9] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(3):267-283.
- [10] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(8):581-593.
- [11] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L et al Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008; 319(5867):1244-1247.
- [12] Yu X, Riley T, Levine AJ. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS J*. 2009; 276(8):2201-2212.
- [13] Smalheiser NR. Do Neural Cells Communicate with Endothelial Cells via Secretory Exosomes and Microvesicles? *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009; 2009:383086. Epub 2009 Aug 3. (Pub Med)
- [14] Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ. Et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*. 2009; 10:556.
- [15] Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luidert TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells // *Am J Pathol*. 2004; 164(5): 1807-1815.
- [16] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer // *Br J Cancer*. 2009; 100(10): 1603-1607.
- [17] Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, Schalken JA. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice // *Eur. Urol*. 2009; 56(2): 275-86.
- [18] Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // *BMC Cancer*. 2009; 9:244.
- [19] Rabinowits G, Gergel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer // *Clin Lung Cancer*. 2009; 10(1): 42-6.
- [20] Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes // *FASEB J*. 2009; 23(5): 1541-1557.
- [21] Skog J, Wälchli T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat Cell Biol*. 2008; 10(12): 1470-1476.
- [22] Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer // *Int J Cancer*. 2005; 113(5): 752-760
- [23] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature* 227(5259): 680-685.
- [24] Patrick H. O'Farrell. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins // *J Biol Chem*. 1975 May 25; 250(10): 4007-4021.
- [25] Görg, A., Postel, W., Günther, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients // *Electrophoresis* 9, P. 531-546 (1988).

REFERENCES

- [1] Leon S.A., Shapiro B., Servi P., Parsons R.G. A comparison of DNA and DNA-binding protein levels in malignant disease. *Eur. J Cancer* 1981; 17:533-538
- [2] Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease. *Cancer* 1983; 51:2116-2120
- [3] Auer P., Stroun M., Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes in vitro. *Cancer Res* 1975; 35:2375-2378
- [4] Nagornev V.A., Voskan'janc A.N. Apoptoz i ego rol' v aterogeneze. *Medicinskij akademicheskij zhurnal*. 2003; 3(4): 3-19.
- [5] Sepiashvili R.I., Shubich M.G., Kolesnikova N.V., Slavjanskaja T.A., Lomtadize L.V. Apoptoz v immunologicheskikh processah. *Allergologija i immunologija*, 2000; 1(1): 15-23.
- [6] Soroka N.F., Svirnovskij A.I., Rekun A.L. Apoptoz limfocitov perifericheskoy krovi u bol'nyh sistemnoj krasnoj volchankoj: patogeneticheskie i klinicheskie aspekty. *Nauchno-prakticheskaja revmatologija*, 2006; 4: 44-52
- [7] Hasselmann D.O, Rappl G., Tilgen W. et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clinical Chemistry*. 2001; 47, (8):1488-1489
- [8] Spirina L.V., Kondakova I.V. Rol' vnukletochnoho specificheskogo proteoliza v onkogeneze. *Voprosy onkologii*. 2008; 54(6):690-694.
- [9] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insight and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(3):267-283.

- [10] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-593.
- [11] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-1247.
- [12] Yu X, Riley T, Levine AJ. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS J*. 2009;276(8):2201-2212.
- [13] Smalheiser NR. Do Neural Cells Communicate with Endothelial Cells via Secretory Exosomes and Microvesicles? *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009;2009:383086. Epub 2009 Aug 3. (Pub Med)
- [14] Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ. Et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*. 2009;10:556.
- [15] Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luijckx TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells // *Am J Pathol*. 2004;164(5):1807-1815.
- [16] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Brakefield XO, Widmark A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer // *Br J Cancer*. 2009;100(10):1603-1607.
- [17] Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, Schalken JA. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice // *Eur Urol*. 2009; 56(2): 275-86.
- [18] Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // *BMC Cancer*. 2009;9:244.
- [19] Rabinowits G, Gergel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer // *Clin Lung Cancer*. 2009;10(1):42-6.
- [20] Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes // *FASEB J*. 2009;23(5):1541-1557.
- [21] Skog J, Wälchli T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Brakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470-1476.
- [22] Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer // *Int J Cancer*. 2005;113(5):752-760.
- [23] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature* 227(5259): 680-685.
- [24] Patrick H. O'Farrell. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins // *J Biol Chem*. 1975 May 25; 250(10): 4007-4021.
- [25] Görg, A., Postel, W., Günther, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients // *Electrophoresis* 9, R.531-546 (1988).

З. С. Качиева^{1,2}, Ш. М. Нурмолдин², Н. О. Накисбеков²

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,

²С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

РЕВМАТОИДТЫ АРТРИТ, СҮТ БЕЗІ ҚАТЕРЛІ ІСІГІ, МИОКАРД ИНФАРКТІСІ ЖӘНЕ ОСТЕОПОРОЗБЕН АУРАТЫНДАРДЫҢ ҚАНЫНДАҒЫ ЭКЗОСОМАЛАРДЫҢ НӘРУЫЗДЫҚ ЖӘНЕ МИКРОРНҚ СЕКТРІНІҢ РӨЛІН ЗЕРТТЕУ

Аннотация. Ревматоидты артрит, сүт безі қатерлі ісігі, миокард инфарктісі және остеопорозбен ауыратын адамдардың экзосомаларының микроРНҚ-сы мен нәруыздарының спектрі зерттелді.

Біз әлеуметтік маңызы бар аурулармен ауыратын адамдардың экзосомаларының нәруыз және микроРНҚ спектрлерін сипаттадық. Зерттеу жұмыстарын жүргізу барысында, микроРНҚ және нәруыз құрамының сәл өзгергенін тіркедік, ол осы бағытта терең зерттеулер жүргізуге негіз болып келеді. Зерттеу барысында ауру мен бақылау топтарының адамдарының арасында нәруыз және микроРНҚ спектрінде өзгешеліктер анықталды, бұл біздің ары қарай протеомды және транскриптомды анализдерді жасап, жергілікті популяцияға арналған диагностикалық мәліметтер базасын жасауға және қолдануға мүмкіншілік береді.

Түйін сөздер: экзосома, ревматоидты артрит, остеопороз, микроРНҚ, сүтбезісігі, миокард инфарктісі.

Сведения об авторах:

Качиева Зульфия Сабирқызы – КазНУ им. аль-Фараби, PhD докторант кафедры молекулярной биологии и генетики, kachieva@gmail.com;

НИИ ФМП им. Б.А.Атчабарова, КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, младший научный сотрудник; раб. тел. 8(727)3387090 (внут. 7099).

Нурмолдин Шалкар Мурзабекович – НИИ ФМП им. Б.А.Атчабарова, КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, младший научный сотрудник.

Накисбеков Нарымжан Окасович – НИИ ФМП им. Б.А.Атчабарова, КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, заместитель директора.