

**Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова**

Щербо Сергей Николаевич

МикроРНК:

**НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ЛАБОРАТОРНОЙ
И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ.**

МИР РНК

Определяющая роль РНК в синтезе белков была предсказана ещё в 1939 г. в работе Т. Касперссон, Ж. Брачета и Дж Шульца.

В 1956–57 гг. в Советском Союзе А.Н. Белозерский и А.С. Спирин независимо доказали существование **мРНК**, а также выяснили, что основную массу РНК в клетке составляет **рибосомальная РНК** (рРНК), которая служит основой для рибосом (сложных нуклеопротеиновых комплексов, основная функция которых – сборка белка из отдельных аминокислот на основе мРНК).

тРНК: доставляют аминокислоты к месту сборки белков – в активный центр рибосомы, «ползущей» по мРНК.

НЕ КОДИРУЮЩИЕ РНК

В 1993 г. В. Амбромс, Р. Ли и Р. Фейнбраум при изучении гена *lin-14*, задействованного в развитии у нематоды *Caenorhabditis elegans* обнаружили, что количество белка LIN-14 **регулировалось коротким РНК-продуктом** гена *lin-4*.

В результате последующих исследований оказалось, что существует и достаточно многочисленный класс так называемых **малых, не кодирующих РНК**.

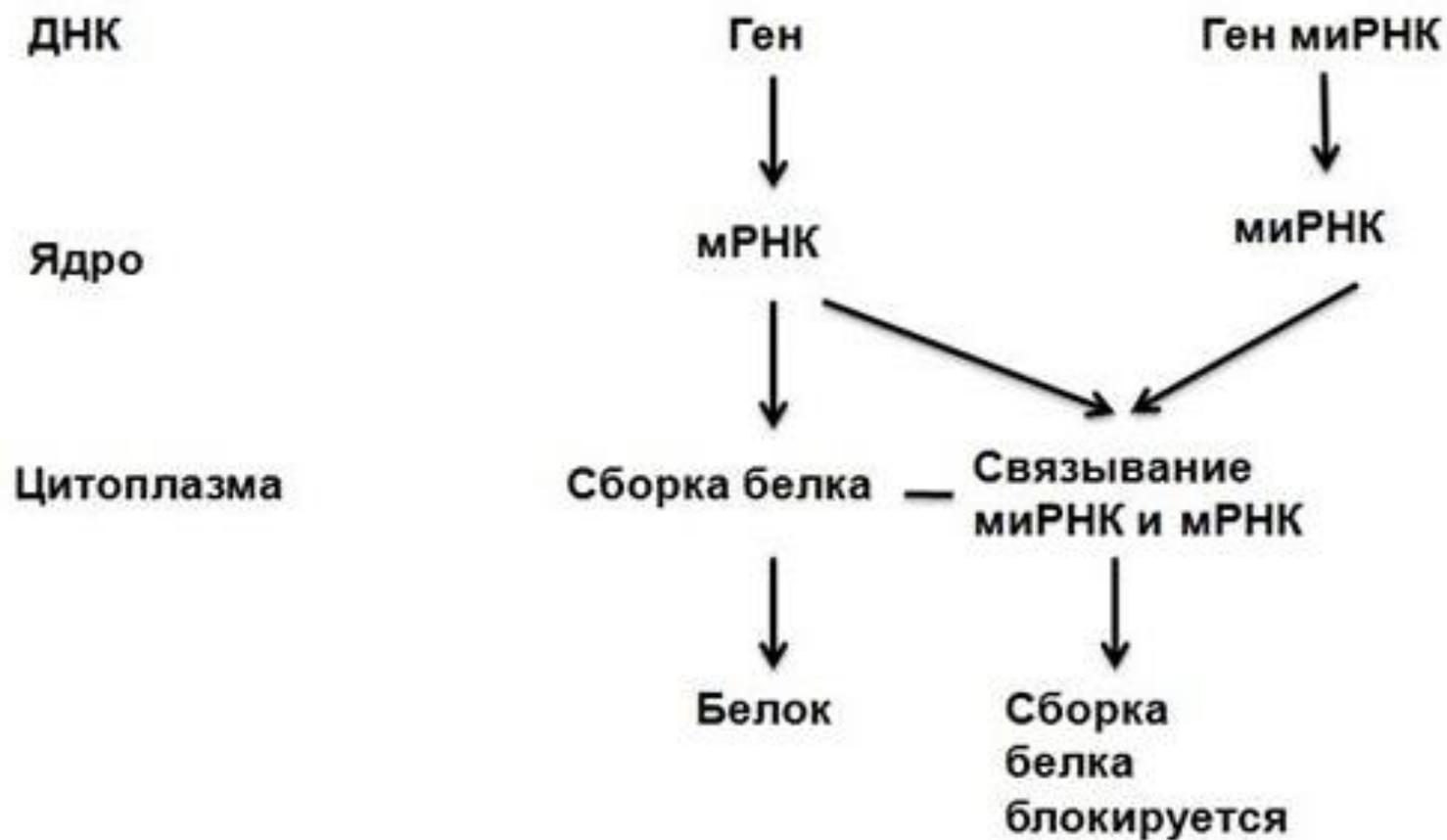
рi-РНК, ответственна за развитие половых клеток и ни одно млекопитающее мужского пола не может размножаться без них.

МикроРНК

МикроРНК (miRNA) – это класс малых некодирующих молекул РНК, которые имеют длину около **22 нуклеотидов** (18-25), обнаруженные у животных, растений и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. МикроРНК кодируются ядерной ДНК растений и животных и вирусной ДНК у некоторых ДНК-содержащих вирусов.

Известно более 2000 микроРНК человека и цифра продолжает расти. По разным оценкам, мишенями микроРНК являются от 30 до 60 % белоккодирующих генов человека. Количество различных микроРНК у человека может достигать 37 тыс.

ГЕНОМ человека содержит ~ 25 тыс генов и 1600 генов миРНК



микроРНК принимают участие в:

регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, запуская механизмы блокировки трансляции или разрушения мРНК, содержащих комплементарные или частично комплементарные им последовательности.

в ряде случаев могут регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, оказывая влияние на модификацию гистонов и метилирование промоторных участков ДНК.

в регуляции различных физиологических процессов: клеточной дифференцировки, деления, апоптоза, функций эндокринной системы, морфогенеза различных органов.

развитии патологических процессов в таких заболеваниях как рак, наследственные и вирусные заболевания.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ микроРНК

Один белок может регулироваться десятками разных микроРНК.

Одна микроРНК может регулировать работу более сотни разных генов.

При опухолевом процессе микроРНК выступают как онкогены и супрессоры опухолей.

БИОГЕНЕЗ микроРНК

1. Из гена или из интрона копируется крупная РНК, состоящая из сотен или тысяч нуклеотидов. В этой копии находится шпилька – участок двухцепочечной РНК, внутри которой и находится будущая микроРНК.

2. Для её производства в ядре есть белки с названиями *Pasha* («Паша») и *Drosha* («Дроша»). Вместе они образуют комплекс для процессинга микроРНК, задача отрезать от шпильки всё лишнее. С ней белки успешно справляются, и специальный транспортный комплекс отправляет небольшую (60-90 нуклеотидов) пре-микроРНК в цитоплазму.

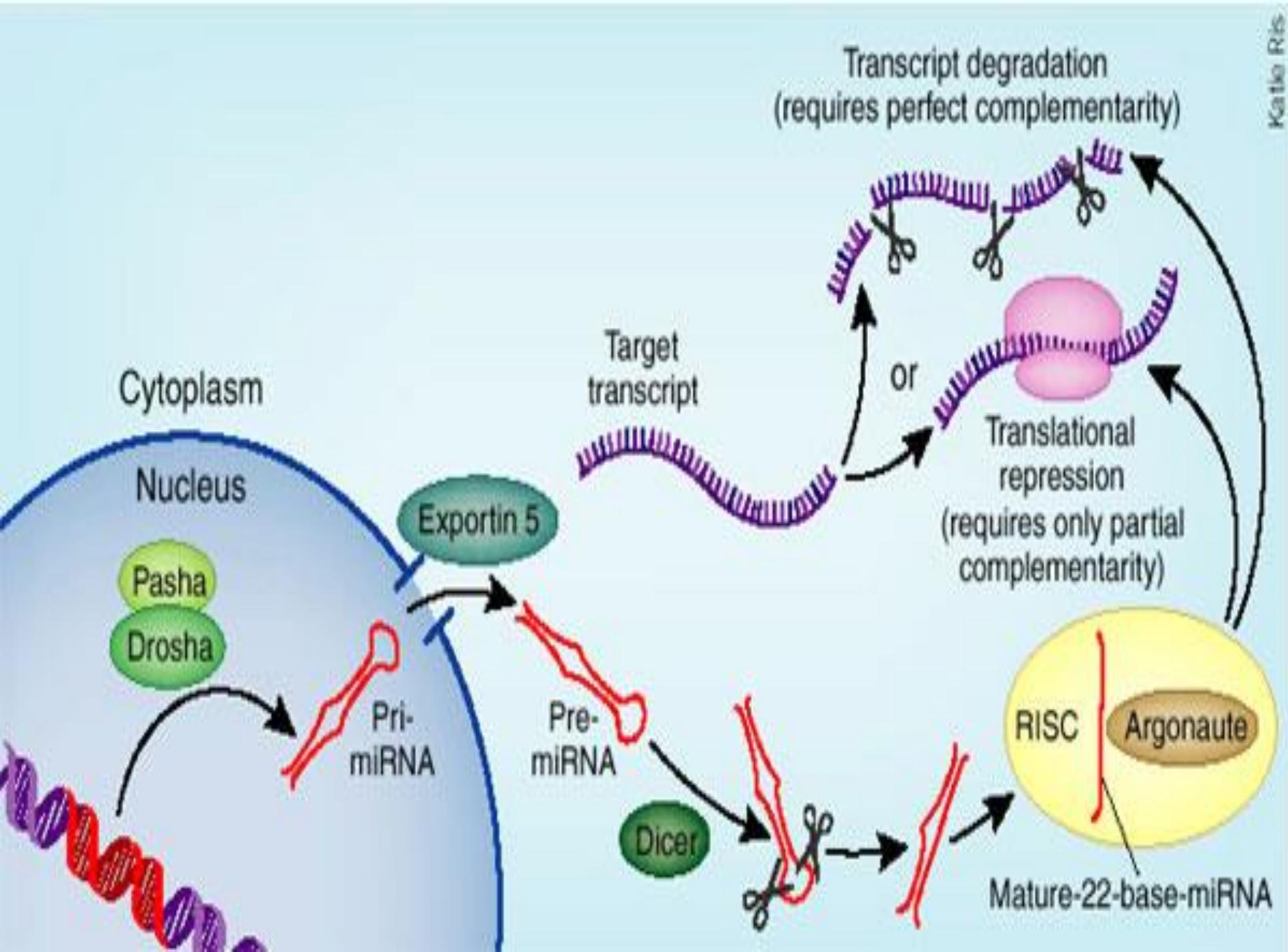
3. Белок *Dicer* («Дайсер») отрезает оставшиеся лишние фрагменты: получается зрелая микроРНК

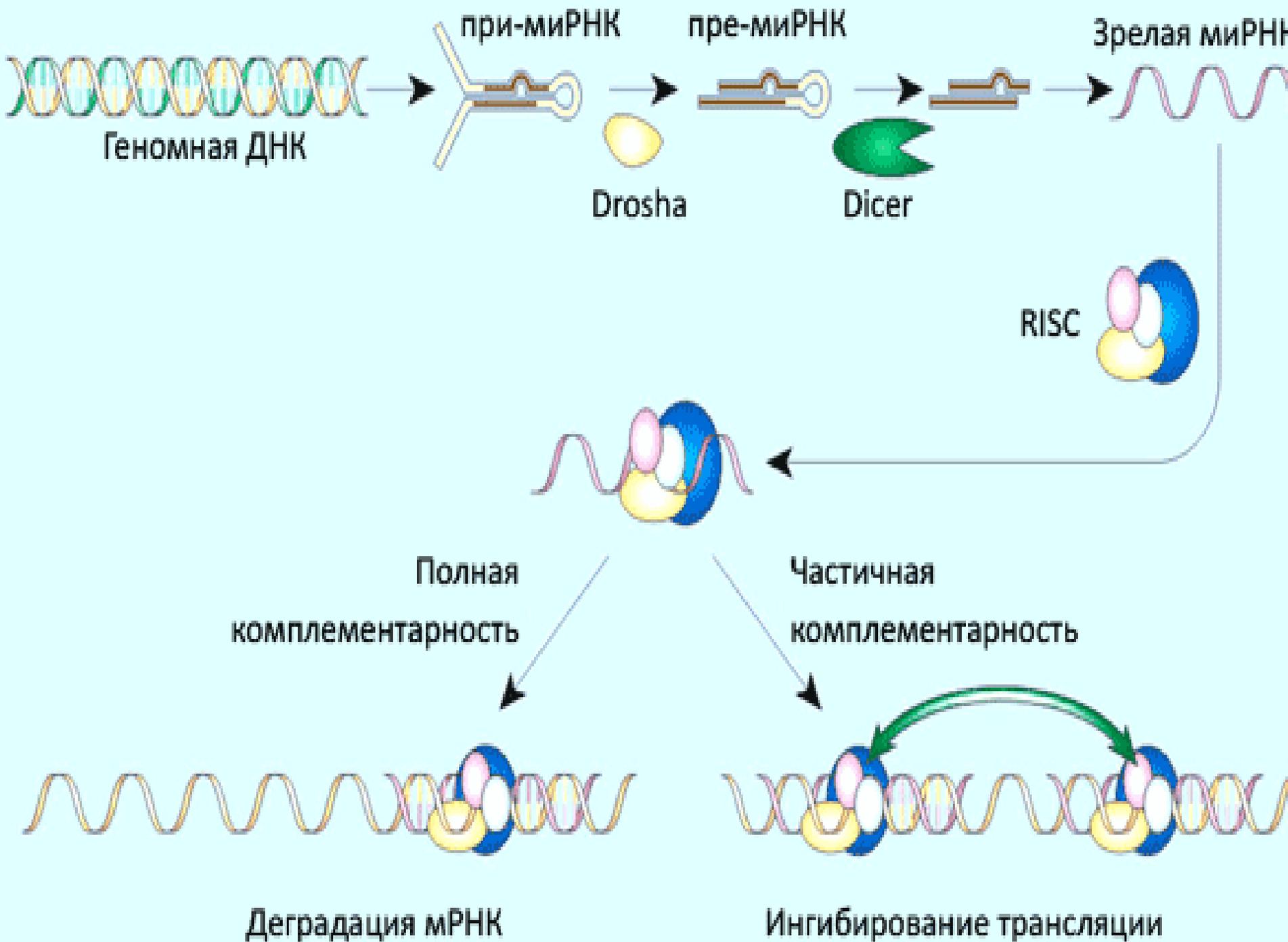
Процессинг в цитоплазме.

4. Одна из двух цепей микроРНК загружается в комплекс ферментов: РНК-индуцируемый **микроРНК-рибонуклеопротеиновый комплекс выключения гена** (RNA-induced silencing complex (RISC)), в котором осуществляется взаимодействие микроРНК и её мРНК-мишени.

5. Центральную роль в функционировании RISC играют белки семейства **Argonaute (Ago)**, которые имеют четыре домена и связывают зрелую микроРНК и ориентируют её подходящим образом для взаимодействия с мРНК-мишенью.

Выключение гена может осуществляться путём деградации мРНК при полной комплементарности или предотвращения её трансляции, если полной комплементарности нет.





ДИРИЖЕРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ОРКЕСТРА

Неполная специфичность действия микроРНК приводит к тому, что одна и та же микроРНК влияет на трансляцию не одной мРНК, а на множество, причем неравномерно: с одними мРНК она будет взаимодействовать лучше, с другими хуже. Поэтому синтез одних белков будет подавляться больше, а других меньше. На один и тот же белок будут влиять многие микроРНК, так как 3'-участок содержит места для присоединения десятков микроРНК.

МикроРНК могут тонко регулировать процессы в организме. Неполное связывание позволяет блокировать трансляцию частично – на 10, 20 или 90%: каждая из микроРНК влияет на трансляцию десятков белков.

МикроРНК оказались вовлечены практически во все процессы жизнедеятельности организма: от оплодотворения и развития до адаптации к новым условиям и механизмам заболеваний.

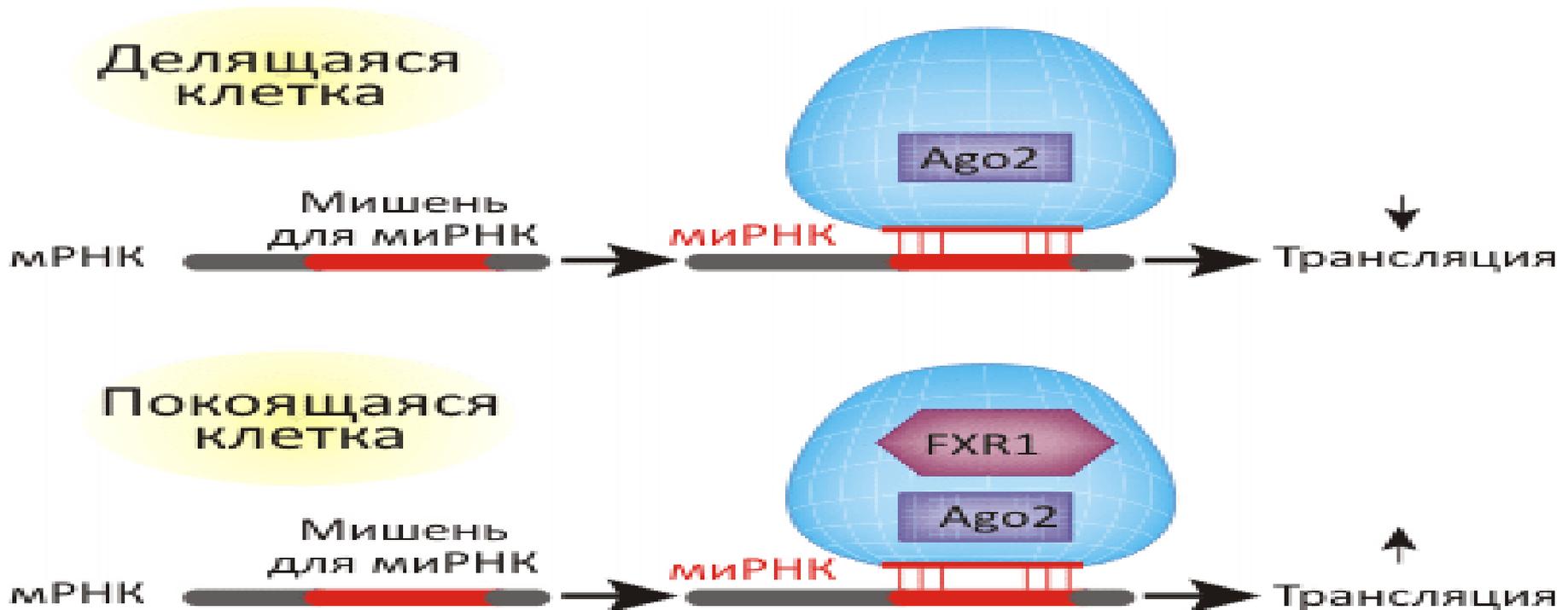
За открытие РНК-интерференции (РНКи) в 2006 г. американцы К. Мелло и Э. Файр получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

РНКи – это механизм подавления экспрессии (активности) гена на стадии трансляции (синтеза белка из аминокислот), либо нарушение транскрипции (перенос информации с ДНК на РНК) определенных генов. В процессе РНКи принимают участие два типа малых молекул РНК – микроРНК и малые интерферирующие РНК (siRNA). Малые РНК связываются со специфическими последовательностями других молекул РНК и повышают или понижают их биологическую активность.

В активно делящейся клетке микроРНК, связавшись с комплементарной последовательностью в 3'-нетранслируемом участке мРНК, **ингибирует синтез белка** (трансляцию).

В покоящейся клетке то же самое событие приводит к **прямо противоположному эффекту**.

Rusk N. (2008). When microRNAs activate translation. *Nature Meth.* 5, 122–123.



МикроРНК животных и растений

Чен Ю Янг и его коллеги из Нанкинского Университета занимаются проблемами микроРНК животных и растений.

Ученые протестировали образцы крови 21 добровольца на наличие микроРНК из сельскохозяйственных культур, таких как рис, пшеница, картофель и капуста. Результаты показали, что в крови испытуемых содержится около 30 различных микроРНК из клеток наиболее распространенных сельскохозяйственных культур.

Специфические микроРНК риса подавляют процесс образования «плохого холестерина» в крови и даже контролируют его выведение из организма.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА микроРНК:

Гибридизационный анализ

Микробиочипы

Амплификационные методы

Секвенирование



ВЫДЕЛЕНИЕ микроРНК

МикроРНК обычно выделяют из клеточных линий и тканей, которые охлаждаются и фиксируются формалином в парафине.

МикроРНК устойчивы к деградации эндогенными рибонуклеазами и, следовательно, стабильны что выявлено при количественных измерениях в плазме и крови. Уровень микроРНК в крови или плазме можно оценить с помощью количественной ПЦР и некоторых других методов.

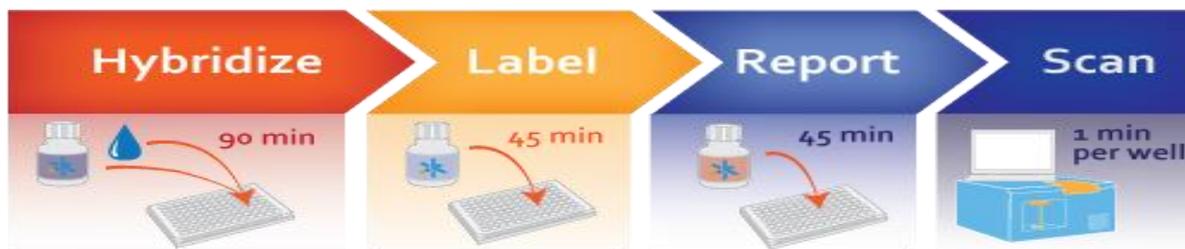
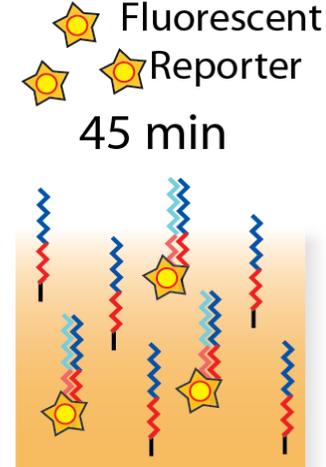
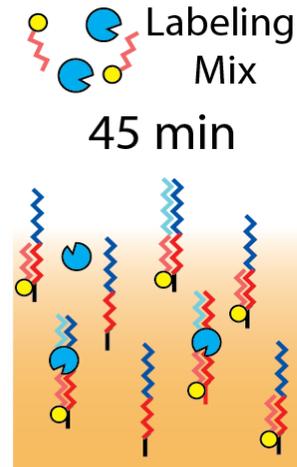
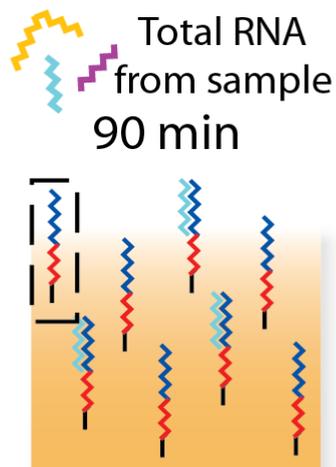
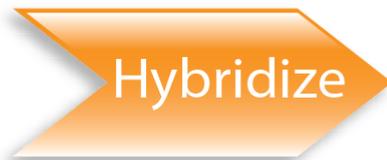
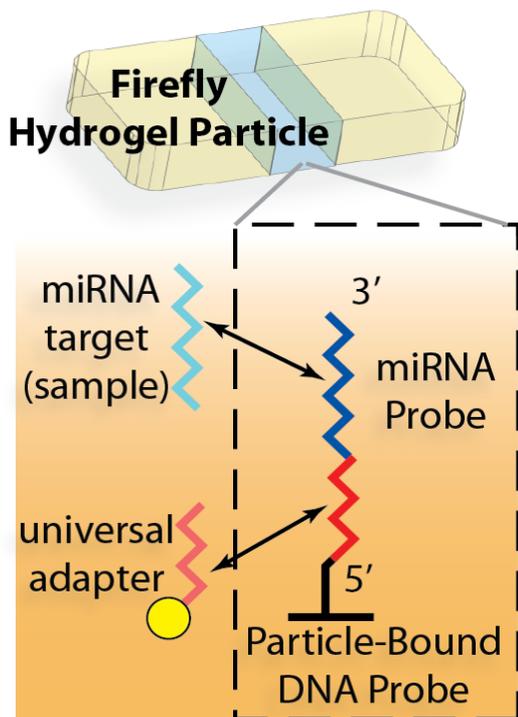
В отличие от мРНК микроРНК обладают очень высокой стабильностью, что, скорее всего, обусловлено их инкапсулированием в эндосомоподобные частицы, где они защищены от деградации нуклеазами.

МИКРОБИОЧИПЫ

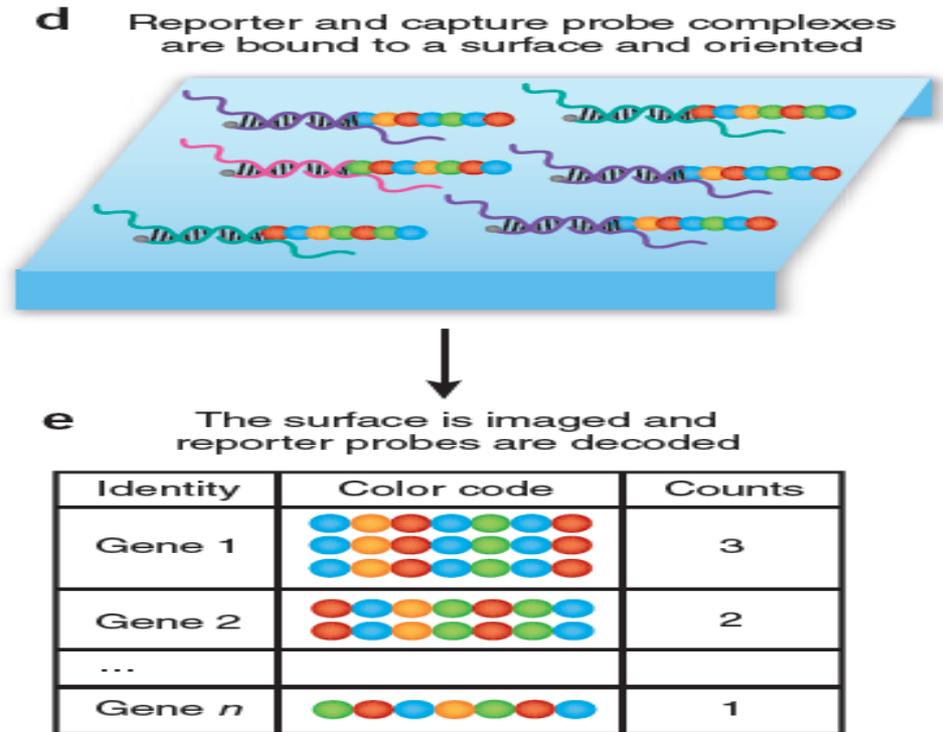
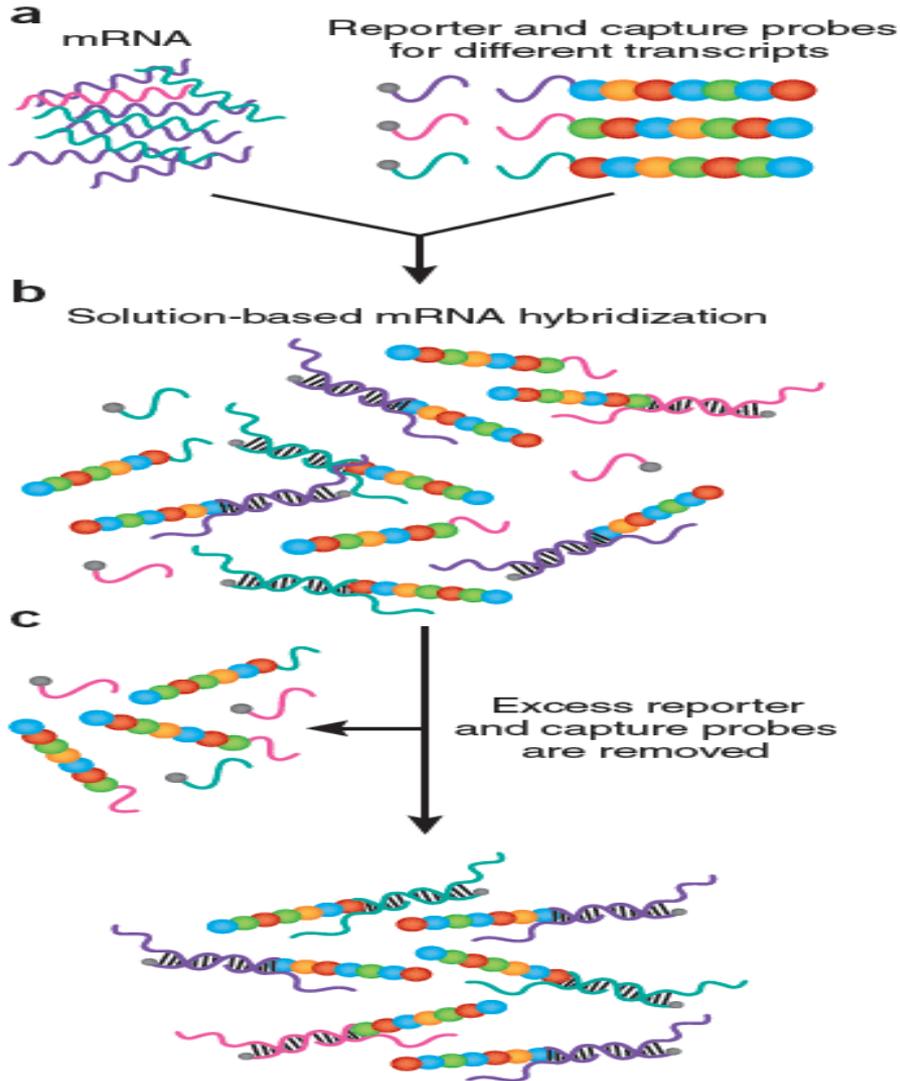
Микробиочипы обладают тем преимуществом, что можно получить профиль микроРНК в данном образце, а также определить те из них, которые представляют интерес для дальнейших исследований. Первые микробиочипы не могли дифференцировать пре-микроРНК, при-микроРНК и микроРНК, однако после усовершенствования мечения и выбора зондов значительно улучшило специфичность.

Небольшая длина микроРНК создает определенные трудности не только при подборе праймеров для ОТ-ПЦР, но и количественной оценки при применении технологии микробиочипов. Введение химически модифицированных зондов (LNA-зонды, Morpholino олигонуклеотид или 2'-O-метил РНК олигонуклеотид) позволило ужесточить условия и привело к большей специфичности гибридизации микроРНК.

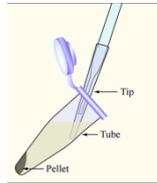
Firefly™ микроРНК анализ



ТЕХНОЛОГИЯ НАНОСТРИНГ



Методический подход определения уровня экспрессии микроРНК в раковых клетках vs прилежащих нормальных клеток у одного пациента.



Условная норма

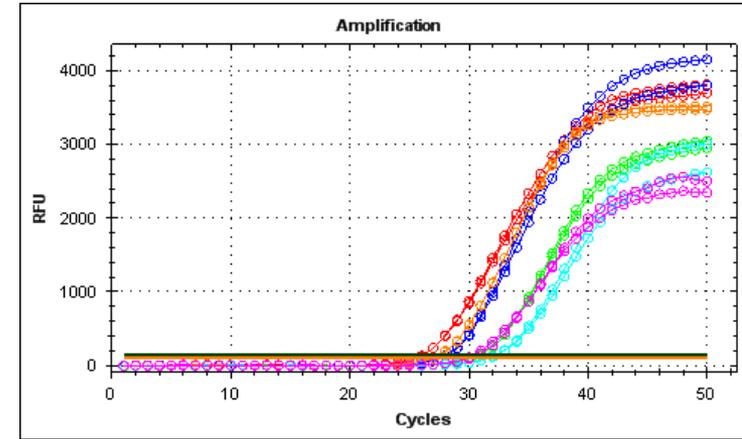
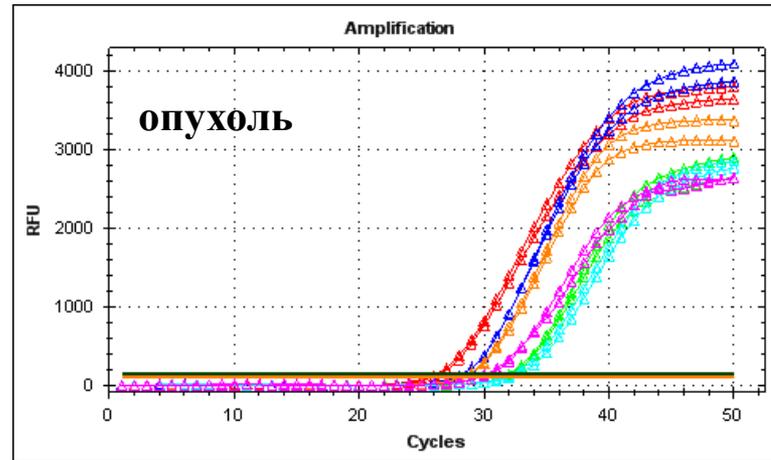
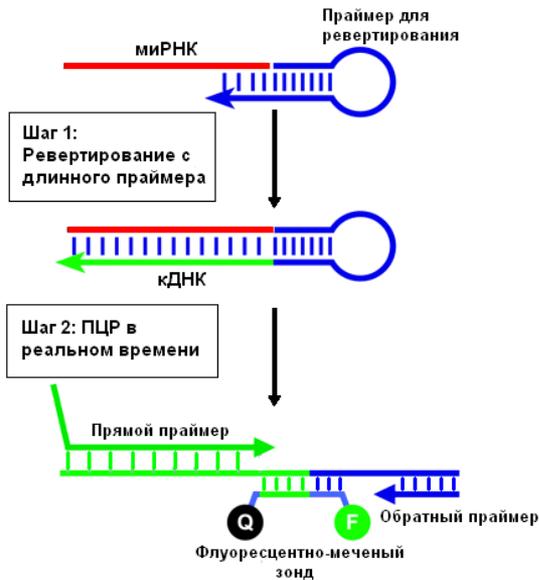


Схема детекции микроРНК с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени



- miR-155
- miR-205
- miR-21
- miR-221
- miR-222
- U6

Глубокое секвенирование микроРНК

Метод позволяет уверенно
идентифицировать новые неизвестные
последовательности микроРНК и может быть
использована и для количественной оценки РНК,
так как многие короткие РНК могут быть
прочитаны сотни раз.

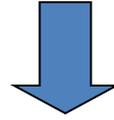
Для сопоставления данных по мРНК и микроРНК используются специальные базы данных, которые предсказывают мРНК-мишень для данной микроРНК, основываясь на данных по её последовательности. Разработан также ряд методов для определения мишени для данной микроРНК.

МикроРНК и болезни



Genomics (DNA- 25,000 genes)

Геномика



Transcriptomics (RNA - 100,000 mRNA's)

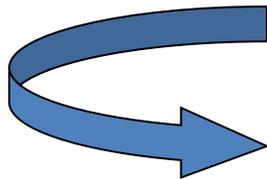
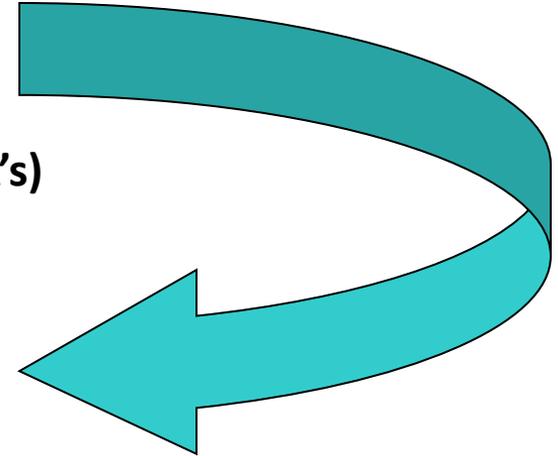
Транскриптомика

микроРНК



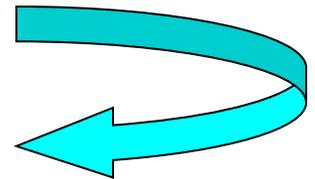
Proteomics (Proteins - 1,000,000 proteins)

Протеомика



Metabolomics (molecules)

Метаболомика



ОПРЕДЕЛЕНИЯ

СТАТИЧЕСКИХ И ДИНАМИЧЕСКИХ ОМИКов

ГЕНОМИКА – ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ ГЕНОВ И МУТАЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К НАСЛЕДСТВЕННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ ИЛИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

ТРАНСКРИПТОМИКА –ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ МАТРИЧНЫХ РНК, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА мРНК И ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ВСЕХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ У ДАННОГО ЧЕЛОВЕКА В ДАННЫХ УСЛОВИЯХ

РНомика – ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И ИЗМЕРЕНИЕ ИХ У ДАННОГО ЧЕЛОВЕКА В КОНКРЕТНЫХ УСЛОВИЯХ

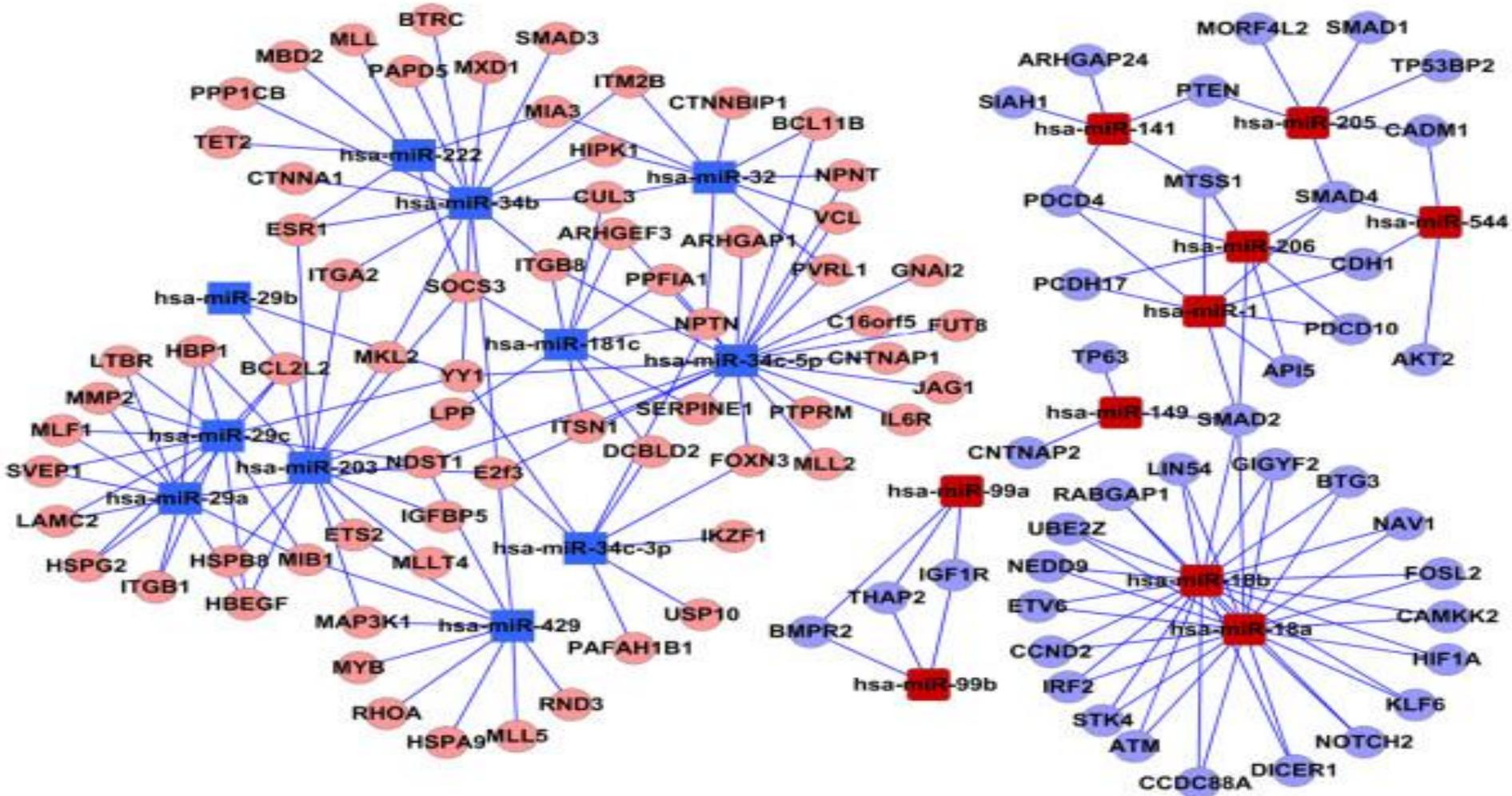
РЕГУЛИРОВАНИЕ микроРНК каскадов генов

Каждая отдельная микроРНК регулирует отдельный каскад генов, активируя экспрессию одних генов каскада и подавляя экспрессию других.

Некоторые группы микроРНК могут участвовать в регуляции нескольких процессов на клеточном уровне.

Например, **микроРНК-21 участвует как в блокировании апоптоза, ангиогенеза, так и в развитии фиброза.**

Сети микроРНК



Полиморфизм микроРНК , новый класс полиморфизмов в геноме человека.

Проект геном человека выявил присутствие миллионов полиморфизмов в кодирующих и некодирующих частях генома. Некоторые из указанных полиморфизмов присутствуют в микроРНК генах и в фрагментах целевых генов с которыми микроРНК соединяются.

Cancer

Leukemia (CLL), lung cancer (NSCLC), colorectal cancer, papillary thyroid carcinoma and breast cancer

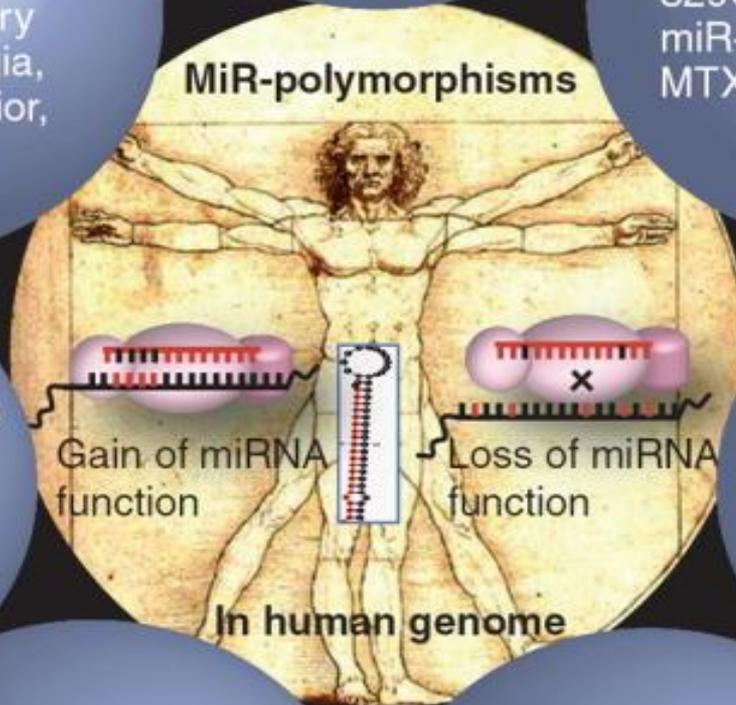
Neurological disorders

Tourette syndrome, ADHD, hereditary spastic paraplegia, aggressive behavior, Parkinson's disease

Drug resistance

829C>T in DHFR genes
miR-24
MTX resistance

MiR-polymorphisms



Hypertension and cardiovascular disease

An 1166A>C *AGTR1* gene miR-155

Muscular hypertrophy & gastric mucosal atrophy

Diarrhea, irritable bowel syndrome (IBS-D)

Type 2 diabetes

ACAA- insertion/deletion

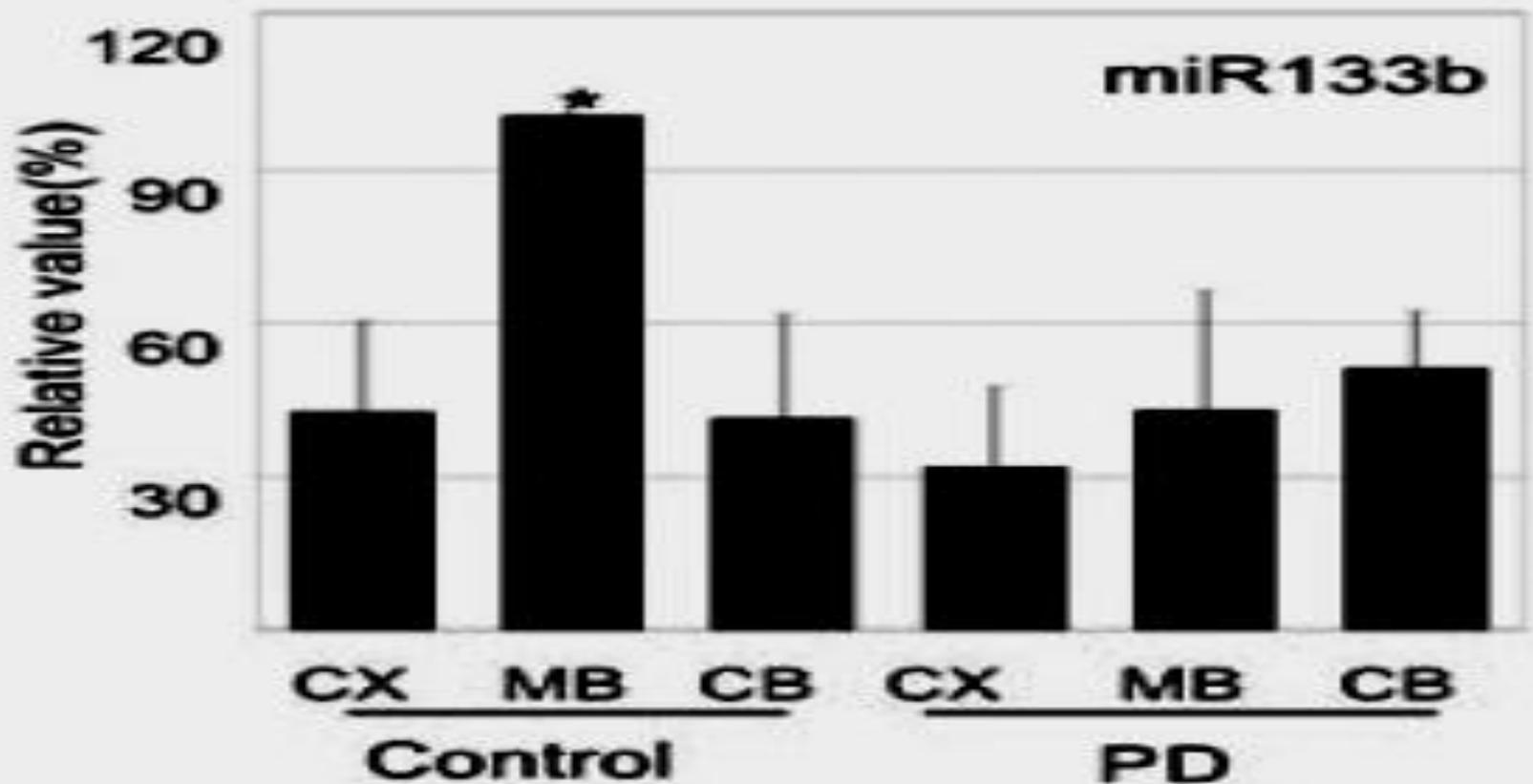
ДИАБЕТ, ОЖИРЕНИЕ

Группой микроРНК, регулирующих инсулинорезистентность и вовлечённых в развитие ожирения и диабета, является семейство let-7, которое накапливается в тканях по мере старения.

Подавление let-7 может не только предотвращать развитие диабета и ожирения, но и использоваться для лечения этих заболеваний. Поэтому подавление let-7 может стать новым средством лечения ожирения и диабета 2 типа.

Концентрация miR-133b в различных отделах мозга у больных паркинсонизмом и у здоровых людей (control): СХ — кора больших полушарий, МВ — средний мозг, СВ — мозжечок,. Хорошо видно, насколько содержание этой специфической микроРНК в среднем мозге у больных людей.

Рис. из Kim J., Inoue K., Ishii J. et al.// Science. – 2007. – 317. – P. 1220-1224.



СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

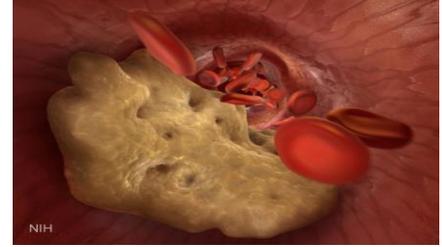
Две микроРНК-1 и 21 могут рассматривать как причинные при нескольких патологических состояниях сердечно-сосудистой системы, в том числе при сердечной недостаточности и гипертрофии сердца (наряду с микроРНК 23а, 133а, 195, 208, 208а).

Показана ассоциация

микроРНК-155 при гипертонии, микроРНК-145 и 21 при заболевании сосудов, микроРНК-17-5р, 20а при легочной гипертензии.

Пять микроРНК-18b, 221, 222, 424 и let-7f-2 локализованы на X-хромосоме, поэтому число копий таких микроРНК различается у мужчин и женщин, что определяет гендерные различия в возникновении и развитии ССЗ.

АТЕРОСКЛЕРОЗ



Атеросклероз является системной, хронической патологией, сопровождающейся развитием эндотелиальной дисфункции при активном вовлечении в процесс воспалительного и иммунного компонентов.

Среди большого числа микроРНК, участвующих в регуляции воспалительных процессов, особое внимание заслуживают микроРНК–21 и 146. Одним из основных блокаторов воспалительной активности генов является микроРНК - 21, активация которой угнетает выработку фактора некроза опухоли, а также активируются интерлейкины 6 и 13.

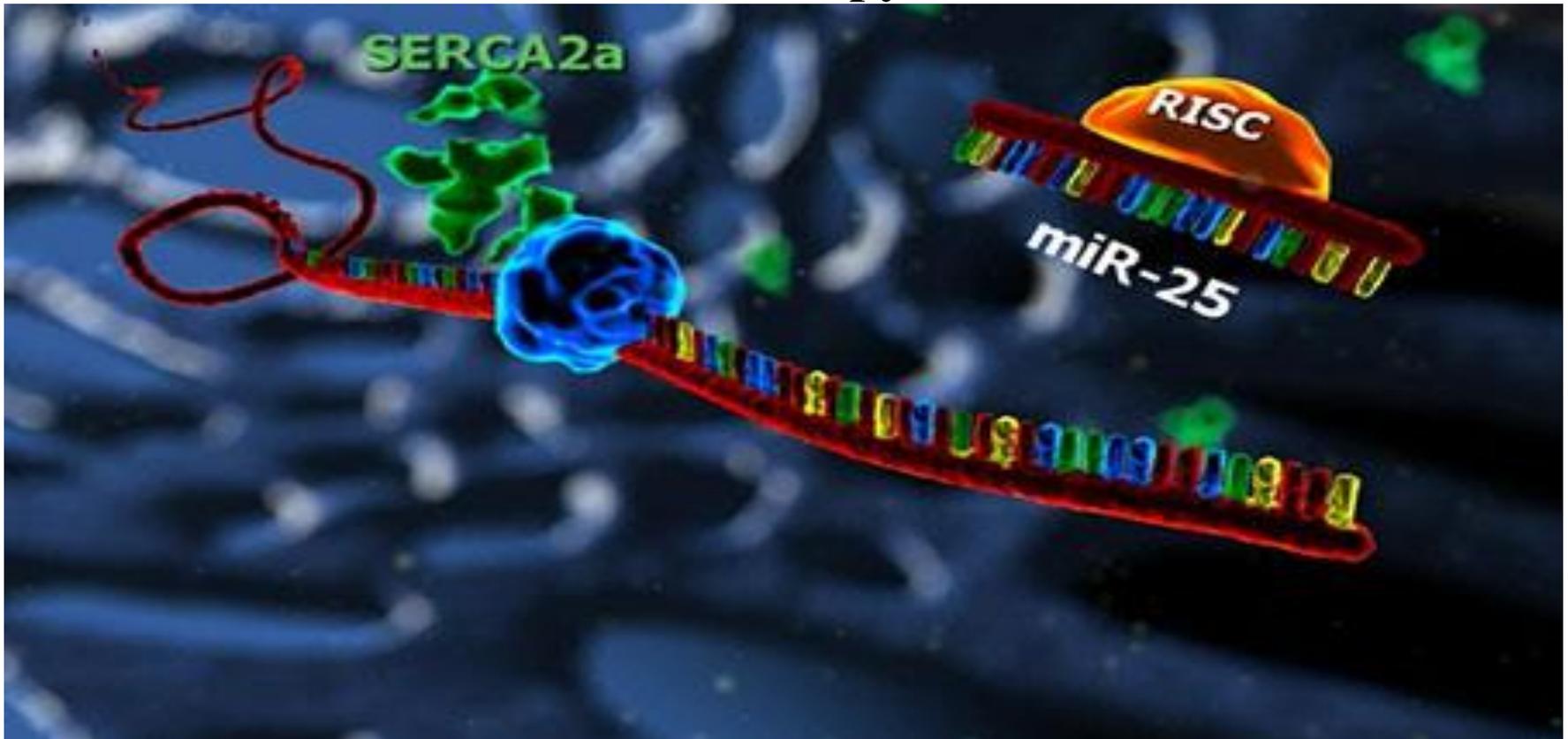
Сердечная недостаточность

При сердечной недостаточности происходит подавление гена SERCA2a, который регулирует поступление кальция в клетки сердечной мышцы и важен для сократительной функции сердца.

Проведен скрининг 875 микроРНК и нашли одну, **микроРНК-25**, которая мощно подавляла поглощение кальция клетками сердца. У пациентов с сердечной недостаточностью активируется микроРНК-25 и введение агента, **блокирующего микроРНК-25,** **улучшает функцию и повышает выживаемость.**

Активность гена SERCA2a была повышена с помощью технологии, позволяющей инактивировать микроРНК-25 антисмысловой РНК.

Молекула антисмысловой РНК – последовательность, комплементарная конкретной молекуле РНК, называемой в этом случае «смысловой», которую она инактивирует.



Типы микроРНК, регулирующих развитие ИБС

микроРНК	Ген-мишень	Биологическое действие	Ссылки
миРНК 1	Bcl2,HSP60,HSP70	Индукция апоптоза	[15]
миРНК 133	caspase-9,TGF- β	Блокирование апоптоза	[16]
миРНК 21	PDCD4,AP1 PTEN,Akt,MMP2 Spry1	Снижение апоптоза в краевых областях инфаркта, деградация молекул межклеточного матрикса, инфильтрация фибробластов, контроль за распространением фиброза	[18] [24] [23]
миРНК 320	HSP20	Активация апоптоза, увеличение размера инфаркта	[11, 19]
микроРНК 29	Коллаген	Регулирование фиброза, уменьшение повреждения миокарда	[25]
микроРНК 126	Spred-1,VCAM-1, integrin alfa-6, VEGF, FGF	Регулирование развития коллатеральных сосудов	[29] [30]
миРНК17-92:	TSP-1	Индукция ангиогенеза,	[31] [32]
миРНК 17-5p	CTGF	участие в регуляции гипоксии	
миРНК17-3p	HIF-1 α		
миРНК18a			
миРНК19a			
миРНК20a			
миРНК19-b-1			
миРНК92-1			
миРНК17-92:	VEGF	Блокирование ангиогенеза, уход от гипоксии	[37, 38]
миРНК15-b	HIF-1 α		
миРНК16			
миРНК20a			
миРНК20b			
миРНК130a	GAX HOXA5	Регуляция сигналинга в эндотелиоцитах	[33]
миРНК210	HIF-1 α Eph-3	Регулирование развития гипоксии, контроль ангиогенеза	[35]
миРНК221	c-Kit	Блокирование пролиферации эндотелиоцитов, блокирование ангиогенеза	[36]
миРНК328	CD44	Блокирование образования капиллярных структур	[37]

микрОРНК в диагностике онкологических заболеваний

- Дифференцировать доброкачественные опухоли от злокачественных новообразований
- Контролировать эффект терапевтического воздействия (лучевая и химиотерапия)
- Выявлять различные патоморфологические типы опухолей
- Ранняя диагностика
- Определение гистотипа опухоли, стадии развития, потенциала к метастазированию
- Прогностическое значение выживаемости
- Потенциальная терапия

СЛОЖНЫЙ ГЕНОМНЫЙ ЛАНДШАФТ ОПУХОЛИ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ NGS ПОКАЗАЛО ЧТО ОПУХОЛЬ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ СОВОКУПНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОФИЛЯМИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ.

МОДЕЛЬ «ВЕТВЯЩЕЙСЯ ЭВОЛЮЦИИ»: ОПУХОЛЬ ИНИЦИИРОВАНА КЛЕТКАМИ, НЕСУЩИМИ ПЕРВИЧНУЮ МУТАЦИЮ, ЧЕРЕЗ НЕКОТОРОЕ ВРЕМЯ ДАЕТ НАЧАЛО ЦЕЛОМУ РЯДУ КЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ (ЛОМАЕТСЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ДНК)

ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ПОЗВОЛЯЮТ ВЫЯВЛЯТЬ РАЗНООБРАЗИЕ ИХ ГЕНОМНЫХ НАРУШЕНИЙ И ИЗМЕНЕНИЙ ТРАНСКРИПТОМОВ.

микроРНК и ОНКОЛОГИЯ

МикроРНК-21–хронологически первая идентифицированная микроРНК. Является сильным онкогеном, экспрессия которой увеличивается в большинстве солидных опухолей. Увеличивает пролиферативную и инвазивную активность опухолевых клеток.

МикроРНК-221, 222 – онкогенные микроРНК, индуцирующие ангиогенез и пролиферацию раковых клеток.

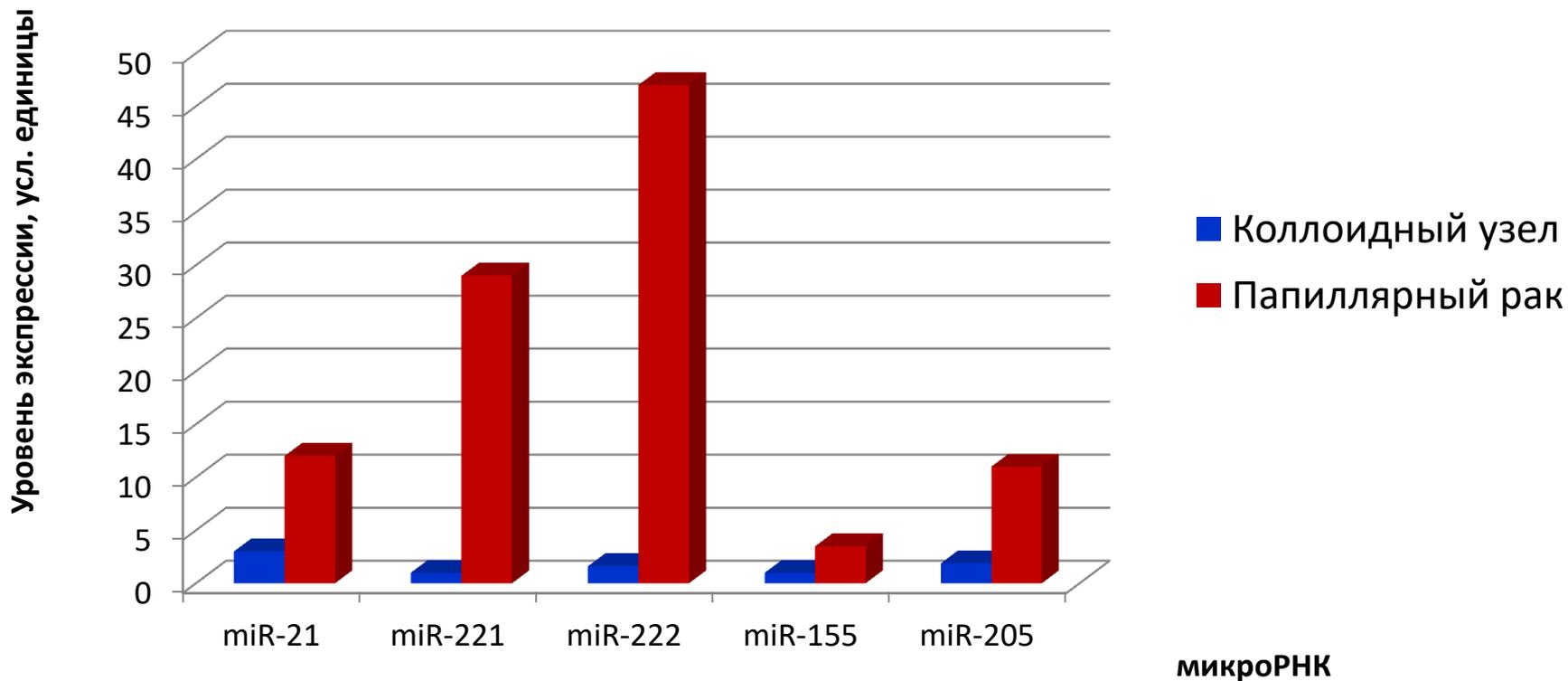
МикроРНК-155 – продемонстрировано участие этой микроРНК в инициации как врожденного, так и адаптивного иммунных ответов, а также в развитии иммунной системы в целом. Некоторые работы свидетельствуют об участии микроРНК155 в онкогенезе различной этиологии.

Метилирование

Одним из механизмов регуляции генов микроРНК является метилирование CpG-островков их промоторных участков. Показано отсутствие метилирования промоторных CpG-островков генов микроРНК -107 и 130b при немелкоклеточном раке легкого и выявлены корреляции частоты метилирования генов микроРНК-125 b-1 и 137 с показателями прогрессии заболевания. Анализ метилирования может проводиться с применением метилспецифичной ПЦР.

МикроРНК при папиллярном раке и коллоидном узле щитовидной железы

Сравнение уровней экспрессии микроРНК при папиллярном раке и коллоидном узле



МикроРНК и рак молочной железы (РМЖ)

Для РМЖ значительно изменятся паттерн микроРНК. Для 13 микроРНК наблюдается повышение экспрессии, а для 49 уровень экспрессии снижен. Специфичность в этом случае составляет **78,8%, а чувствительность **92,5%**. Выявление и оценка уровня экспрессии определенных микроРНК становится важным направлением в диагностике ранних стадий РМЖ.**

Экспрессия микроРНК-195 повышена в опухолях, а в крови ее уровень превышает нормальный в десятки раз. Экспрессия этой микроРНК коррелирует с уровнем экстрагеновых рецепторов. Содержание микроРНК-195 снижается после оперативного вмешательства.

Оценка уровня циркулирующих в крови микроРНК-10b, 34a и 155 позволяет дискриминировать больных с метастазирующими опухолями от здоровых людей.

МикроРНК и рак молочной железы (РМЖ)

Ранние РМЖ связаны и с **увеличением** концентрации микроРНК-21 и 155 и уменьшением микроРНК-125b и 145. Причем уровень микроРНК-21 коррелирует со стадией заболевания, метастазами и плохим прогнозом по времени жизни пациентов с РМЖ на поздних стадиях опухолевого процесса.

МикроРНК-155, которая обнаружена в крови больных, чувствительных к гормонотерапии, и отсутствует в крови больных, не чувствительных к этому виду терапии, и **может служить маркером-предиктором при выборе терапии.**

Рак легкого

На ранних стадиях развития немелкоклеточного рака легкого (НРЛ) в крови больных существенно повышено содержание микроРНК-21, 125 и 574-5p по сравнению с уровнем в норме. При этом специфичность их определения, т.е. выявления именно при этой форме рака легкого, в крови у больных с диагностированным НРЛ составляет 82%, а чувствительность 77%.

Еще три микроРНК: микроРНК-155, 197 и 182 в комбинации дают сходные уровни чувствительности и специфичности при использовании метода количественной ПЦР.

Прогноз и метастазирование.

Другое применение микроРНК в диагностике и лечении раковых заболеваний может заключаться в их использовании для составления прогноза.

При немелкоклеточном раке легкого низкая концентрация микроРНК-324а может служить индикатором плохой выживаемости.

Высокая концентрация микроРНК-185 или низкая микроРНК-133b свидетельствуют о наличии метастазов и, следовательно, плохой выживаемости при раке толстой и прямой кишки.

Метастазирование и прогресс опухолей

Особый интерес вызывает использование микроРНК в прогнозе метастазирования, в частности, микроРНК-10b и 373.

МикроРНК-7 обладает свойствами антиметастатической микроРНК в опухолях желудка в результате взаимодействия с мРНК, кодируемой геном рецептора инсулиноподобного ростового фактора (IGF-R).

Известны 18 микроРНК, которые считаются индикаторами прогрессии опухолей печени.

Профиль трех микроРНК (9, 182 и 200b) может определять агрессивность опухолей мочевого пузыря.

ЭКЗОСОМЫ

Термин «экзосомы» используется для обозначения специфических везикулярных структур эндосомального происхождения, которые продуцируются большинством типов эукариотических клеток.

В 2007 г. показано присутствие в составе экзосом мРНК и микроРНК, а также некодирующую РНК, что показало их участие в регуляторно-коммуникативных процессах внутри организма и возможность их использования в качестве потенциальных биомаркеров.

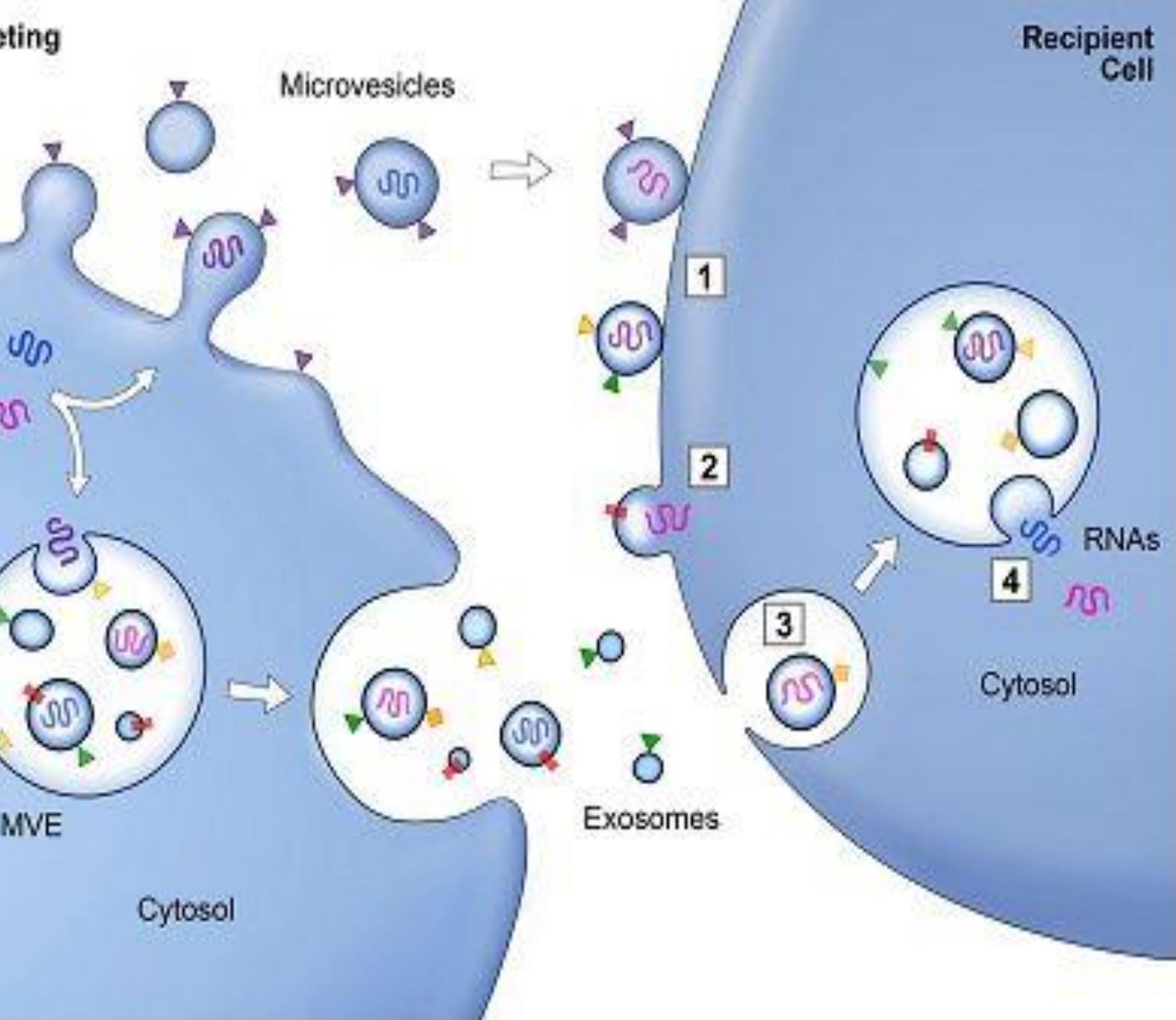
Перенос интактных мРНК в составе экзосом может служить для обмена фенотипическими признаками между клетками.

СВОЙСТВА ЭКЗОСОМ

Экзосомы представляют собой небольшие везикулярные тела размером 50-90 нм (по другим данным от 30-100 нм), которые формируются из поздних эндосом.

Полость экзосом имеет цитоплазматическое происхождение, а мембрана образуется в результате впячивания внутрь эндосомальной мембраны. Экзосомы могут продуцироваться *in vitro* большинством типов клеток: В- и Т-клетками, гранулоцитами, тромбоцитами, нейронами, эпителиальными клетками и др.

Первое научное описание экзосом представлено в 1983 г.



МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ

Классический протокол выделения экзосом включает несколько последовательных стадий центрифугирования, позволяющих избавиться от клеток и более крупных частиц и процесс осаждения экзосом путем центрифугирования при 100000g. Использование фильтрования через мелкопористые фильтры (0,1-0,2 мкм), может исключить попадание в итоговый крупный микровезикул.

БД РНК В СОСТАВЕ ЭКЗОСОМ

Была создана электронная база данных **ExoCarta (<http://exocarta.org>)**, содержащая информацию о белках, липидах, мРНК, микроРНК экзосом различного происхождения.

Предпринята попытка провести компьютерный анализ последовательностей экзосомальных РНК

(Batagov A.O., Kuznetsov V.A., Kurochkin I.V.//BioMed Central Ltd. – 2011. – 12. – 18.).

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ЭКЗОСОМ – БИОМАРКЕРЫ

Экзосомы несут в своем составе белки, липиды, нуклеиновые кислоты, которые могут быть использованы как биомаркеры продуцирующих их нормальных или патологических клеток. Присутствие экзосом в клинических жидкостях (плазма крови, моча, слюна, грудное молоко и др.) позволяет использовать неинвазивные или малоинвазивные методы взятия пробы.

Показана высокая стабильность нуклеиновых кислот в клинических жидкостях, причем уровни присутствующих РНК можно оценить с применением метода ПЦР. Считается также, что большая часть межклеточных РНК могут переноситься вне везикулярных образований.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РНК ЭКЗОСОМ В ДИАГНОСТИКЕ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

- диагностика травм головного мозга по наличию специфических везикулярных микроРНК в спинномозговой жидкости.
- ранняя диагностика сосудистых заболеваний.
- диагностика асимптоматического течения сахарного диабета по специфическим профилям микроРНК крови.
- диагностика на основе выделения экзосомальных микроРНК из слюны пациентов с аутоиммунным системным заболеванием (Синдрома Шегрена). Данный неинвазивный метод может стать альтернативой биопсии). (Michael A., Vajracharya S.D., Yuen P.S. et al.// Oral Dis. – 2010. – 16. – P. 34-38.)

ПРОФИЛИ микроРНК в диагностике раков

Сходные результаты получены при исследовании профиля микроРНК экзосом здоровых доноров и пациентов с раком легких.

(Rabinowits G., Gercel-Taylor C., Day J.M. et al.// Clin. Lung Cancer. – 2009. – 10. – P. 42-46.)

Разрабатываются наборы с использованием экзосом мочи при диагностике рака простаты: две специфические мРНК (PSA и продукт специфической хромосомной перестановкиTMPRSS2:ERG), которые известны своей гиперэкспрессией при указанном раке, были выявлены в образцах экзосом мочи пациентов.

ЭКЗОСОМЫ И ВИРУСЫ

Экзосомы участвуют в распространении и поддержании популяции некоторых патогенов, к которым относятся вирусы и прионные белки.

Согласно данным анализа РНК-профиля экзосом инфицированных клеток показано, что в везикулах содержатся микроРНК, кодируемые вирусом Эпштейна-Барра и которые могут передаваться в неинфицированные клетки.

В то время как ДНК ВЭБ были обнаружены только в популяции В-лимфоцитов, микроРНК ВЭБ – не только в указанных клетка, но и в других (неинфицированных) клетках пациентов с повышенным уровнем вируса в организме.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

