


**ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ**

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист
по клинической лабораторной
диагностике
Департамента здравоохранения города
Москвы

 _____ А.Н. Цибин
«__» _____ 2022 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 18



**ВЫДЕЛЕНИЕ МАЛЫХ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ
СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДЕПРЕССИЕЙ, ОЦЕНКА ИХ
КОЛИЧЕСТВА И ЛИПИДНОГО СОСТАВА**

Методические рекомендации № 99

Москва 2022

УДК 577.151
ББК 28.707.2
В92

Организация-разработчик: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Научно-практический психоневрологический центр им. З.П.Соловьева Департамента здравоохранения города Москвы

Составители:

Яковлев А.А. – ведущий научный сотрудник, д.б.н.
Дружкова Т.А. – ведущий научный сотрудник, к.б.н.
Лазарева И.А. – научный сотрудник
Моисеева Ю.В. – старший научный сотрудник, к.б.н.
Зинчук М.С. – ведущий научный сотрудник, к.м.н.
Гехт А.Б. – директор ГБУЗ Научно-практического психоневрологического центра им. З.П.Соловьева ДЗМ, д.м.н., профессор, член-корр. РАН
Гуляева Н.В. – зав. отделом изучения нейробиологических механизмов пограничных психических расстройств, д.б.н., профессор

Рецензенты:

Годков М.А. – д.м.н., зав. научным отделом лабораторной диагностики ГБУЗ НИИСП им. Н.В.Склифосовского ДЗМ
Медведев А.Е. – д.б.н., руководитель лаборатории фармакопротеомики НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича

Выделение малых экстраклеточных везикул из сыворотки крови пациентов с депрессией, оценка их количества и липидного: методические рекомендации/ составители: А.А. Яковлев, Т.А. Дружкова, Н.А. Лазарева [и др.]. М. ГБУЗ НПЦ им. Соловьева ДЗМ, 2022-36 с.

Методические материалы адресованы научным сотрудникам, специалистам медицинских организаций, сотрудникам клинико-диагностических лабораторий, а также аспирантам и ординаторам, обучающимся в области нейрохимии болезней мозга.

Данные методические рекомендации разработаны в ходе выполнения научно-исследовательской работы «Изучение фундаментальных и клинических аспектов болезней мозга»

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения

ISBN

© Департамент здравоохранения города Москвы,
2022
© ГБУЗ НПЦ им. Соловьева ДЗМ, 2022
© Коллектив авторов, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕПРЕССИВНОГО РАССТРОЙСТВА	5
2 МАЛЫЕ ЭВ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА	6
2.1 Малые ЭВ в диагностике неврологических заболеваний	6
2.2 Малые ЭВ в диагностике депрессивного расстройства	6
3 ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ МАЛЫХ ЭВ ДЛЯ ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ..8	
3.1 Протокол метода выделения мЭВ из сыворотки крови гель-фильтрацией с последующей количественной оценкой фракции мЭВ.....	8
3.1.1 Характеристика участников исследования	8
3.1.2 Биологический материал для исследования мЭВ.....	9
3.1.3 Метод выделения мЭВ с помощью гель-фильтрации.....	10
3.1.4 Оценка концентрации мЭВ анализом траектории наночастиц.....	10
3.1.5 Оценка концентрации мЭВ с помощью метода динамического светорассеяния Ошибка! Закладка не определена.	
3.1.6 Оценка концентрации выделенных мЭВ методом иммуноферментного анализа Ошибка! Закладка не определена.	
3.1.7 Оценка концентрации белка из выделенной фракции мЭВ по методу Бредфорда Ошибка! Закладка не определена.	
3.1.8 Оценка общей концентрации липидов из выделенной фракции мЭВ.....	11
3.1.9 Статистическая обработка результатов.....	11
3.1.10 Различия по количеству мЭВ и сопутствующим лабораторным показателям сыворотки крови между группами участников исследования.....	12
3.2 Протокол выделения мЭВ из сыворотки крови методами преципитации полиэтиленгликолем (ПЭГ) и гель-фильтрацией с последующей сравнительной количественной оценкой полученных фракций мЭВ	15
3.2.1 Характеристика участников исследования.....	16
3.2.2 Методики выделения и оценки мЭВ.....	17
3.2.3 Результаты сравнения двух методов выделения мЭВ.....	17
4 ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ МАЛЫХ ЭВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА.21	
4.1 Протокол выделения мЭВ из сыворотки крови, повышающий их количество в пробе для последующего липидного анализа	21
4.1.1 Характеристика участников исследования.....	22
4.1.2 Определение концентрации холестерина в выделенных образцах мЭВ	22
4.1.3 Определение концентрации триглицеридов в выделенных образцах мЭВ	23
4.2 Оценка уровня триглицеридов и холестерина в выделенных образцах мЭВ	23
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	27
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	28
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	29

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
г/л – грамм/литр
ИМТ – индекс массы тела
КДЛ – клиничко-диагностическая лаборатория
мЭВ – малые экстраклеточные везикулы
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ЭВ – экстраклеточные везикулы
BDI – Beck Depression Inventory
BD – Bipolar Disorder
BPD – Borderline Personality Disorder
BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor
CNTF – Ciliary Neurotrophic Factor
EPI w MDD – Epilepsy with Major Depressive Disorder
EPI w/o MDD – Epilepsy without Major Depressive Disorder
HCL-32 – Hypomania Checklist-32
HDRS – Hamilton Depression Rating Scale
HSP70 – Heat Shock Protein 70
ILAE – International League Against Epilepsy
кспс – тысяча фотонов в секунду
LAMP1 – Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
mL – миллилитр
mmol/L – миллимоль/ литр
ug/mL – микрограмм/ миллилитр
μmol/L – микромоль/литр
uIU/mL – микроединица/миллилитр
MDD – Major Depressive Disorder
MMSE – Mini-Mental-State-Examination
ng/mL – нанограмм/миллилитр
MOG – Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
PBS – Phosphate-Buffered Saline
PIPES – piperazine-N,N'-bis (2-ethantsulfonic acid)
PLP – Proteolipid protein
pg/mL – пикограмм/миллилитр
pmol/L – пикомоль/миллилитр
PNS – Psychogenic Nonepileptic Seizures
SOD1 – Superoxide dismutase 1
STAI_s – State Trait Anxiety Inventory state
STAI_t – State Trait Anxiety Inventory trait
TDP-43 – Transactive response DNA binding Protein 43
TSH3 – Thyroid Stimulating Hormone
FUS – Fused in sarcoma

ВВЕДЕНИЕ

Депрессивные расстройства являются гетерогенной группой психических заболеваний с разной степенью проявления и выраженности клинических и физиологических показателей [1, 2]. Многочисленные исследования патогенеза депрессии свидетельствуют о том, что в его основе лежит комплексное нарушение нервной, эндокринной и иммунной регуляции организма, приводящее к снижению нейропластичности, гормональному дисбалансу, нейровоспалению, эпигенетическим модификациям [3-7]. Развитие депрессии в значительной степени обусловлено нарушением сложных межклеточных взаимодействий, как в самом мозге, так и за его пределами [8].

Исследования последних лет показали, что малые экстраклеточные везикулы (мЭВ, коллективное название экзосом и микровезикул) являются одними из основных участников взаимодействия клеток в головном мозге как в норме [9-12], так и при развитии патологии [13-17]. Малые ЭВ представляют собой окруженные мембраной везикулы размером 50-200 нм, которые секретируются практически всеми клетками организма, отражая уникальный состав клеток-продуцентов [19]. Циркулируя в биологических жидкостях, мЭВ активно участвуют в межклеточных взаимодействиях, являются переносчиками различных низкомолекулярных метаболитов, белков, липидов, нуклеиновых кислот. Отличительным свойством мЭВ является то, что они проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [20, 21]. Как только это важное свойство мЭВ было установлено, мЭВ сразу же получили статус перспективного диагностического маркера нейропсихических заболеваний, «окна в мозг», и началось их активное исследование при различных патологиях мозга [22].

Степень участия и функциональная значимость мЭВ при депрессии мало изучены. Ситуация осложняется гетерогенностью симптоматики и разной степенью проявления симптомов депрессивных расстройств. Немногочисленные исследования, выполненные в этой области, посвящены, в основном, анализу экспрессии разных микроРНК, которые переносятся мЭВ и могут быть потенциальными маркерами заболевания, [7, 17, 23-25].

К сожалению, в настоящее время практически не разработаны доступные для использования в условиях клиники стандартизированные протоколы по выделению мЭВ и анализу их количественного и качественного состава. Между тем, наличие таких протоколов позволит более объективно оценить состояние пациентов на основе анализа циркулирующих мЭВ и даст клиницистам дополнительную информацию для диагностики и мониторинга состояния пациентов и выбора индивидуальной тактики их лечения.

1 КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕПРЕССИВНОГО РАССТРОЙСТВА

Депрессия (от лат. *depressio* — подавление, угнетение) — психическое расстройство, характеризующееся патологически сниженным настроением, негативной оценкой себя и своего положения в окружающем мире, моторным торможением, когнитивными и соматовегетативными дисфункциями [1].

В последние десятилетия наблюдается стабильное увеличение связанного с депрессией бремени. По прогнозам всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) к 2030 году депрессия станет одной из ведущих причин нетрудоспособности населения [1]. С одной стороны, столь высокое бремя депрессии обусловлено её прямым негативным влиянием на работоспособность людей, с другой стороны — с утяжелением течения целого ряда коморбидных неврологических и соматических заболеваний, таких как эпилепсия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, инсульт, артериальная гипертензия, онкологические заболевания, болезнь Альцгеймера и др. [1, 3]. Наиболее распространёнными методами выявления депрессии являются самоопросники и клиническое интервью. Однако их эффективность зависит от многих ситуационных факторов, важнейшими из которых являются способность пациента верно оценить своё настроение и его желание раскрыть информацию о своём состоянии. Всё это делает актуальными изучение биологических механизмов развития депрессии и продолжение поиска непсихологических маркеров, как развития самой депрессии, так и эффективности её терапии [6, 24]. Кроме того, постановка диагноза депрессии значительно осложняется тем, что клинические симптомы депрессии могут в значительной степени перекрываться с клинической картиной других психических расстройств [3].

Для объективизации диагностики и выбора терапии пациентов с депрессивным расстройством и другими психоневрологическими патологиями с наилучшим возможным ответом, и минимальными побочными эффектами необходимо комплексное использование нейропсихологических тестов, методов визуализации и анализа биохимических маркеров, выделенных из доступных биологических жидкостей.

2 МАЛЫЕ ЭВ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА

2.1 Малые ЭВ в диагностике неврологических заболеваний

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что мЭВ являются уникальным объектом исследования, и их важность для изучения метаболизма в структурах мозга сложно переоценить. Предполагают, что в организме существуют механизмы сигналинга с использованием мЭВ, при помощи которого клетки способны обмениваться информацией о происходящих процессах [26-28]. Было показано, что при болезни Альцгеймера мЭВ из нервных и глиальных клеток головного мозга обнаруживаются в крови. При этом их состав отличается от состава мЭВ здоровых людей [29-34]. В мЭВ пациентов были повышены уровни общего и фосфорилированного белка тау, бета-амилоида 1-42, катепсина D, основного белка мембран лизосом - Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 (LAMP-1), убиквитинилированных белков, и понижена концентрация белков теплового шока HSP70. Было замечено, что состояние попавших в кровь мЭВ клеток мозга больных полностью отражает процессы, которые происходят при болезни Альцгеймера в головном мозге. Было найдено, что в составе мЭВ, выделенных из крови пациентов с болезнью Паркинсона, присутствовал альфа-синуклеин [35-39]. Малые ЭВ, выделенные из крови пациентов с рассеянным склерозом, содержали основной белок миелина, proteolipid protein (PLP) и Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG). При этом, количество мЭВ, циркулирующих в крови больных, было пропорционально тяжести заболевания [40]. При боковом амиотрофическом склерозе в составе мЭВ пациентов присутствовали белки superoxide dismutase 1 (SOD1), transactive response DNA binding Protein 43 (TDP-43), белок fused in sarcoma (FUS), часто выявляемые при этом заболевании, интерлейкин-6 и ангиогенин [41-44]. Список неврологических заболеваний, при которых в составе мЭВ были обнаружены патологические белки, можно продолжить. Подавляющее большинство проведенных исследований указывают на то, что патологический процесс в мозге можно оценивать с использованием мЭВ, выделенных из биологических жидкостей на периферии. Важно отметить, что иногда изменения в составе мЭВ крови обнаруживаются за 10 лет до клинического проявления заболевания [29-31, 39, 45]. На основании накопленных в последние годы данных в научном медицинском сообществе утвердилось мнение о том, что мЭВ можно и нужно использовать для диагностики заболеваний мозга.

2.2 Малые ЭВ в диагностике депрессивного расстройства

Активные исследования диагностической роли мЭВ при психиатрических заболеваниях начались в последние годы. Униполярная и биполярная депрессия стали одними из первых психических заболеваний, при которых были проведены исследования состава мЭВ. Эти исследования, к сожалению, имеют статус предварительных и касаются лишь некоторых компонентов мЭВ [15, 23, 24, 46, 47]. В частности, основное внимание исследователей в этой области было направлено на анализ микроРНК, регулирующих экспрессию генов в тех клетках, в которые их доставляют мЭВ. При попытке разобраться, насколько специфичны выделенные микроРНК для того или иного заболевания, оказалось, что микроРНК не обладают выраженной специфичностью [25]. К настоящему моменту опубликовано несколько десятков работ, посвященных изучению микроРНК, выделенных из крови пациентов с депрессией, биполярным расстройством и шизофренией. В этих работах были обнаружены изменения концентрации сотен уникальных микроРНК, но

всего около тридцати из них подтверждены более, чем в одном исследовании. Из этих тридцати подтвержденных микроРНК, восемь микроРНК изменялись и при депрессии, и при биполярном расстройстве, шесть микроРНК изменялись и при депрессии, и при шизофрении [25]. Таким образом, складывается впечатление, что исследования, ограниченные только микроРНК в мЭВ, являются недостаточно эффективными для оценки состояния пациентов при психических заболеваниях. Не исключено, что микроРНК не проявляют специфичности при изученных патологиях, однако, возможно, что достаточная информация по регуляции микроРНК при психических заболеваниях пока просто еще не получена [25].

Анализ липидного состава мЭВ представляется одним из перспективных направлений поиска везикулярных маркеров психических заболеваний. Давно известно, что при психических заболеваниях, таких как шизофрения, биполярное расстройство, депрессивное и тревожное расстройства, в структурах мозга происходит окислительный стресс [48, 49]. Окислительный стресс выявляется также при течении ряда нейродегенеративных заболеваний. Так, в плазме крови уже на начальных стадиях болезни Альцгеймера появляются окисленные метаболиты холестерина [50]. Результаты нескольких исследований свидетельствуют о снижении уровня сывороточного холестерина у пациентов с депрессивным расстройством [51, 52]. В частности, такие данные были получены при анализе липидного профиля пациентов с депрессивным расстройством, проявляющих склонность к суициду [53]. Имеются публикации последних лет, которые опровергают это утверждение [54]. При несомненной полезности исследований холестерина крови при депрессивном расстройстве реальные метаболические процессы, происходящие в мозге, конечно, остается неизвестным. С этой точки зрения мЭВ из клеток мозга, проникшие через ГЭБ в кровь, могут служить уникальным источником информации о метаболизме холестерина (как и других веществ) в структурах мозга. Есть предположение, что анализ компонентов мЭВ, поступающих из мозга в биологические жидкости, позволит оценить выраженность окислительного стресса в мозге при психических и неврологических заболеваниях. Обращает на себя внимание то, что мембраны мЭВ обогащены холестерином, сфингомиелином и некоторыми ганглиозидами [55-57].

Необходимо отметить, что большинство исследований липидного состава мЭВ было выполнено с использованием клеточных культур. При этом для анализа мЭВ были использованы сложные многостадийные методы, основным из которых являлась масс-спектрометрия [57]. Очевидно, что результаты, полученные на клеточных культурах, не всегда возможно адекватно соотнести с параметрами мЭВ, выделенными из крови человека, в силу гораздо большей сложности объекта.

Представляется более объективным проведение комплекса исследований по анализу липидного состава именно мЭВ, выделенных из крови человека. Для этого крайне важно иметь воспроизводимые и доступные для использования в клинической практике методы выделения мЭВ и оценки их состава. К сожалению, большинство методов исследования мЭВ, имеющихся в арсенале научных лабораторий, в частности масс-спектрометрия, слишком сложны и дорогостоящи для использования в лабораторной практике медицинских учреждений.

3 ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ МАЛЫХ ЭВ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА

Отсутствие в настоящее время общепринятых протоколов выделения и оценки мЭВ представляет собой серьезную проблему. При этом для исследования количественного и качественного состава мЭВ крови с возможностью применения его в клинике востребован хороший отработанный протокол их выделения. В связи с этим первый этап выполнения работы был посвящен выбору, стандартизации и апробации протокола выделения мЭВ и их последующей оценки. Из наиболее доступных и относительно несложных методов выделения мЭВ из биологических жидкостей организма были выбраны два: гель-фильтрация и преципитация при помощи полиэтиленгликоля (ПЭГ).

3.1 Протокол выделения мЭВ из сыворотки крови методом гель-фильтрации с последующей количественной оценкой фракции мЭВ

В последнее время все большую популярность в качестве метода выделения мЭВ из биологических жидкостей приобретает гель-фильтрация [58]. Этот относительно доступный и несложный в исполнении способ выделения мЭВ, дающий хороший выход фракции мЭВ. Гель-фильтрация явилась одним из первых методов, стандартизированных и опробованных на клинической базе НПЦ психоневрологии ДЗМ.

3.1.1 Характеристика участников исследования

Апробация выделения мЭВ из сыворотки крови с помощью гель-фильтрации с последующей количественной оценкой мЭВ различными методами была проведена на сплошной выборке, состоящей из 80 пациентов НПЦ психоневрологии и 22 здоровых добровольцев старше 18 лет без выявленных соматических отклонений. Процедура набора включала сплошное скрининговое исследование пациентов мужского и женского пола психиатрических отделений. Попавшие в сплошную выборку пациенты были условно разделены на следующие группы.

Группа с депрессией (MDD) состояла из пациентов с униполярной депрессией первый эпизод F32.1-F32.3, рекуррентным депрессивным расстройством F33.1-F33.2. Симптомы депрессии были количественно оценены с использованием валидированной русской версии [59] BDI-II [60], которая является "золотым стандартом" для таких исследований. В дальнейшем все пациенты, осматривались врачом-психиатром для подтверждения диагноза и исключения коморбидной психической патологии.

Группа с пограничным расстройством личности (BPD) состояла из пациентов с биполярным аффективным расстройством F31.3 - F31.6, с шизотипическим расстройством личности F21.3 - F21.8, со специфическим расстройством личности F60.1, F60.3, F60.5. Диагноз выставлялся врачом-психиатром. Оценка гипоманиакальных симптомов проводилась в соответствии с валидированной русской версией [61] HCL-32 [62].

В третью группу вошли пациенты с фокальной эпилепсией (G40.1, G40.2, G40.9), которые кроме основного заболевания имели сопутствующий диагноз депрессивного расстройства F32.1, F32.2, F33.1, F33.2 5. Диагноз фокальной эпилепсии был поставлен в соответствии с классификацией Международной лиги по борьбе с эпилепсией (ILAE) [63]. Сопутствующий диагноз был выставлен на основании осмотра врача психиатра.

Все участники исследования подписали информационное согласие.

Все пациенты перед взятием биологического материала прошли психометрическое обследование, включая оценку тревожности по шкалам личной и ситуационной тревоги Стилбергера [64], осмотр врачом-психиатром с заполнением им шкалы Гамильтона [65].

Группы практически не отличались по возрасту и соотношению мужчин и женщин в группе, за исключением группы пациентов с BPD, состоявшей в основном из женщин, которые по возрасту были несколько моложе других участников исследования. Пациенты, попавшие в группу MDD, имели более низкие баллы по психометрическим шкалам и меньшую длительность заболевания. Базовые демографические и клинические данные пациентов и участников контрольной группы приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика участников исследования

Показатель (M±SD)	Контроль n=22	МДД n=38	BPD n=25	EPI n=17
демографические показатели				
возраст	34,1±1,96	33,0±1,47	24,6±1,84 □	33,9±2,23
ИМТ	23,8±1,1	23,9±0,8	21,6±0,9	22,7±1,6
мужчины/женщины	8/14	11/27	1/24	6/11
длительность заболевания (месяцы)		43,3±9	70,4±11,2	124,6±15,6 □□, □□□
психометрические показатели				
BDI 11		21,8±1,9	30,5±2,3 □□	26,4±3,3
STAI _s		55,9±1,8	64,2±2,2 □□	65±3,2 □□
STAI _t		54,7±2,3	57,2±2,8	61,8±4,2
HDRS		17,8±0,7	20,7±0,9 □□	19,7±1,3

MDD – major depressive disorder, BPD – borderline personality disorder, EPI – epilepsy, HDRS – Hamilton Depression Rating Scale, BDI – Beck Depression Inventory, STAI_s – State Trait Anxiety Inventory state, STAI_t – State Trait Anxiety Inventory trait

M±SD - среднее значение ± стандартное отклонение

□ отличие от контрольной группы, □□ отличие от группы MDD, □□□ отличие от группы MDD и BPD, p<0,05

3.1.2 Биологический материал для выделения и анализа мЭВ

Забор крови у пациентов и участников контрольной группы проводили из локтевой вены в утренние часы натощак. Известно, что на образование мЭВ оказывает влияние множество факторов [66]. Поэтому процедура взятия крови и преаналитический этап подготовки проб были максимально стандартизированы. Для всех проб были соблюдены одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, одинаковые системы для забора крови и размер иглы (21,5); промежуток времени (не более 30 минут) и температура в помещении между взятием крови и центрифугированием (22-23°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа. У всех пациентов кровь брали до назначения терапии.

Параллельно с выделением и анализом мЭВ из сыворотки крови для более полной оценки и учета различий самой сыворотки крови пациентов и здоровых добровольцев исследовали ее базовые клинические, биохимические и гормональные параметры.

Клинический анализ крови проводили с использованием гематологического анализатора LH-500 (Beckman Coulter, США).

Биохимический анализ сыворотки крови выполняли с применением автоматического анализатора ILab Aries (Instrumentation Laboratory, Италия) наборами (Biosystems S.A., Испания).

Половые гормоны, гормоны щитовидной железы, кортизол, пролактин, интерлейкин-6 измеряли в сыворотке крови на иммунохимическом анализаторе Access® 2 (Beckman Coulter, США), соответствующими наборами (Beckman Coulter, США). Мозговой нейротрофический фактор (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF) определяли в сыворотке крови соответствующими наборами Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США) с использованием иммуноферментного анализатора ChemWell 2910(Combi) (Awareness Technology, США) по методикам производителя тест-систем.

3.1.3 Метод выделения мЭВ с помощью гель-фильтрации

Перед проведением процедуры выделения пробы сыворотки крови очищали от остатков клеток и высокомолекулярных комплексов последовательным центрифугированием при 4°C в течение 10 минут при 300 g, в течение 20 минут при 1500 g, в течение 30 минут при 10000 g.

Колонку заполняли 10 mL смолы Sepharose CL-2B (GE Healthcare, США) и уравнивали фосфатным буфером (PBS). Предварительно центрифугированную сыворотку крови наносили на колонку в объеме 500 uL, после добавления пробы наносили 3,5 mL PBS, элюат отбрасывали. После этого наносили 1 mL PBS и собирали элюат для последующего анализа. Перед очередной пробой промывали колонку не менее чем 10 mL PBS [67]. После процедуры выделения образцы, содержащие мЭВ, оценивали несколькими способами, определяя количественный выход частиц, размеры частиц и соответствие частиц антигенному составу мЭВ.

3.1.4 Оценка концентрации мЭВ анализом траектории наночастиц

Анализ траекторий наночастиц проводили на приборе NanoSight NS300 (MalvernPanalytical, Великобритания). В качестве источника света был использован лазер с длиной волны 488 нм. Свет от лазера входил в проточную кювету, содержащую образец, и рассеивался на частицах. Под углом около 90 градусов к направлению света находился объектив микроскопа, через который все рассеивающие свет частицы снимались на камеру с частотой 25 кадров в секунду при постоянной температуре. Последующая компьютерная обработка отснятого видео позволяла проследить траекторию движения каждой частицы индивидуально, и, используя уравнение Стокса-Эйнштейна, из величины перемещения за единицу времени вычислить ее размер. Образец постоянно подавался в проточную кювету с помощью шприцевого насоса, что позволяло записать на видео движение большого числа индивидуальных частиц, расход разведенного образца составлял 0.5 mL. Выделенные мЭВ разводили в 25 раз и производили три видеозаписи по 30 секунд для каждого образца, результаты усредняли. При таком разведении в каждом кадре оказывается около ста индивидуальных частиц. Скорость прокачки образца насосом составляла 60 у.е., так что суммарное число треков на каждом видео составляло около двух тысяч. При компьютерной обработке видеозаписей были выставлены одинаковые для всех образцов параметры, принятые для обсчета типичных мЭВ (Blur 5x5, Max. jump 12, Min. tracksteps 5), которые позволяли определять как размер частиц, так и их концентрацию.

3.1.5 Оценка концентрации мЭВ методом динамического светорассеяния

Динамическое светорассеяние частиц в образцах определяли на приборе Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical, Великобритания). В кварцевую кювету наливали 1 mL разведенных в 25 раз в PBS выделенных экстраклеточных везикул и определяли светорассеяние на угол 173 градуса на длине волны 633 нм, выполняя три повтора по 200 секунд каждый. Оборудование позволяло вычислить размер частиц, а также определить общее число отраженных фотонов, выражаемое в единицах (тысяча фотонов в секунду, kcps), которое служило параметром, характеризующим концентрацию частиц в образце.

3.1.6 Оценка концентрации мЭВ методом иммуноферментного анализа

Иммуноферментный анализ сыворотки крови проводили, используя наборы EHO-Test (ELISA) (HansaBioMed, Эстония), предназначенные для количественного определения мЭВ в плазме и сыворотке крови человека по протоколу производителя тест-системы на автоматическом анализаторе ChemWell 2910 (Combi) (Awareness Technology, США).

3.1.7 Определение концентрации белка в выделенной фракции мЭВ по методу Бредфорда

Аликвоты с мЭВ после гель-фильтрации сыворотки крови концентрировали с помощью высаживания 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и ресуспендировали в PBS. Концентрацию белка в полученных образцах определяли с помощью реактива Кумасси G-250. Пробы смешивали с красителем в соотношении 2:3, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут и определяли поглощение при 595 нм с помощью планшетного спектрофлуориметра Hidex Sense (Perkin Elmer, Финляндия). Калибровочную прямую строили по бычьему сывороточному альбумину в концентрации от 0.01 до 2 mg/mL.

3.1.8 Определение общей концентрации липидов в выделенной фракции мЭВ

Пробирки на 1.5 mL предварительно обрабатывали 70 uL хлороформа и инкубировали при постоянном перемешивании при 90°C 10 минут до полного испарения хлороформа. В эти пробирки добавляли по 50 uL фракции мЭВ, находящихся в PBS. К пробам добавляли 250 uL 96% серной кислоты и инкубировали 20 минут при 90°C при постоянном помешивании. После инкубации пробы охлаждали до комнатной температуры, потом добавляли в лунки 96-луночного планшета по 220 uL каждой пробы и по 110 uL ванилинового реагента (0.2 ug /mL в 17% ортофосфорной кислоте). Инкубировали 10 минут при комнатной температуре, затем проводили измерение при 540 нм на планшетном спектрофлуориметре Hidex Sense (PerkinElmer, Финляндия). В качестве стандарта использовали раствор масла в хлороформе в концентрации до 2 ug /mL.

3.1.9 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился в STATISTICA для Windows версии 12.5, StatSoft Inc и GraphPad Prism версии 8. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) или как среднее (min-max). Статистическая значимость различий между группами определялась с помощью анализа дисперсии для

непараметрического распределения (Kruskal-Wallis ANOVA). С помощью теста Данна были проведены попарные сравнения групп. Для выявления взаимосвязи между переменными проводился корреляционный анализ с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) и линейного регрессионного анализа, для которого адекватность модели определяли коэффициентом детерминации (R -квадрат). Выбросы определялись в GraphPad Prism с помощью встроенного алгоритма ROUT ($Q = 1\%$). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

3.1.10 Различия по количеству мЭВ и сопутствующим лабораторным показателям сыворотки крови между группами участников исследования

Гемограмма и биохимический анализ сыворотки крови по основным показателям липидного, углеводного и белкового обмена не выявил выраженных различий между пациентами и здоровыми добровольцами (таблица 2).

Таблица 2 - Лабораторные показатели участников исследования

Показатель (M±SD)	Контроль	МДД	BPD	EPI w MDD
гемограмма				
лейкоциты ($10^3/\text{mL}$)	6,2±0,4	6,5±0,3	6,6±0,3	5,8±0,4
нейтрофилы%	57,3±2,4	53,3±1,8	49,8±2,2	50,3±2,6
лимфоциты %	31,3±2,1	35,3±1,6	38,7±2,0	38,5±2,3
моноциты %	7,5±0,5	8,0±0,4	8,3±0,5	8,3±0,5
гемоглобин, г/л	138,1±3,1	138,5±2,4	129,8±2,9	137,8±3,4
тромбоциты ($10^3/\text{mL}$)	244,4±12,3	223,9±9,4	246,7±11,6	230,7±13,6
эритроциты ($10^6/\text{mL}$)	4,7±0,1	4,6±0,1	4,4±0,1	4,6±0,1
базовые биохимические показатели сыворотки крови				
общий билирубин, $\mu\text{mol/L}$	14,6±1,2	14,3±0,9	13,5±1,2	10,9±1,3
глюкоза, mmol/L	5,7±0,2	5,5±0,1	5,3±0,2	5,4±0,2
креатинин, $\mu\text{mol/L}$	84,5±3,1	82,8±2,1	75,1±2,6	82,4±3,1
мочевина, mmol/L	4,4±0,2	3,6±0,2	3,2±0,2	4,4±0,2
холестерин, mmol/L	4,9±0,2	5,0±0,2	4,9±0,3	5,3±0,4
триглицериды, mmol/L	0,8±0,1	1,4±0,1	1,3±0,2	0,8±0,1
общий белок, г/л	74,2±1,5	70,9±1,3	71,9±3,5	76,4±4,3
гормоны и факторы сыворотки крови				
cortisol, mmol/L	384,3±32,6	454,4±25,8	393,6±31,9	293,7±40,5 □ □
TSH3, uIU/mL	2,3±0,3	1,8±0,3	2,1±0,3	2,7±0,4
Св.Т4, pmol/L	11,3±0,4	11,4±0,4	11,1±0,5	9,8±0,7
BDNF ng/mL	23,3±1,3	21,3±1,0	19,9±1,1	25,3±1,9
CNTF, pg/mL	3,5±0,8	6,4±0,6 □	5,1±0,7	7,6±1,1 □
интерлейкин-6, pg/mL	2,3±0,4	3,3±0,3	1,7±0,4	2,6±0,6

MDD – major depressive disorder, BPD – borderline personality disorder, EPI w MDD – epilepsy with major depressive disorder, TSH3 - Thyroid Stimulating Hormone

M±SD - среднее значение ± стандартное отклонение

□ отличие от контрольной группы, □ □ отличие от группы MDD, □ □ □ отличие от группы MDD и BPD, $p < 0,05$

При определении гормонов и ростовых факторов было выявлено достоверно значимое повышение уровня CNTF у пациентов с эпилепсией и пациентов с депрессией, наиболее выраженное у пациентов с эпилепсией по сравнению с участниками контрольной группы (таблица 2). Самый низкий уровень кортизола наблюдали у пациентов с с фокальной эпилепсией, где была зафиксирована самая большая продолжительность заболевания (таблица 1, таблица 2).

При этом количество мЭВ, выделенных из сыворотки крови было достоверно повышено у пациентов с депрессивным расстройством (МДД) по сравнению с нормальным контролем и пациентами других групп (BPD и EPI) (рисунок 1).

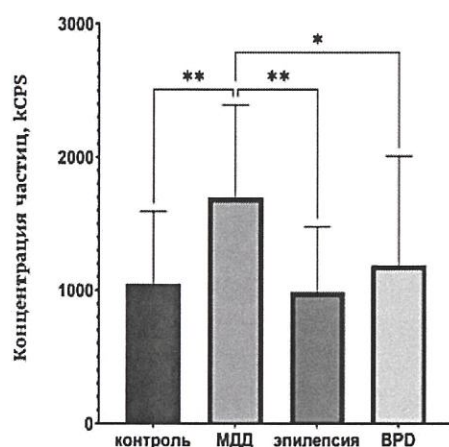


Рисунок 1 - Повышенный уровень мЭВ в сыворотке крови у пациентов с депрессивным расстройством.

MDD – major depressive disorder, BPD – borderline personality disorder,

кспс – тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света).

□ достоверное различие между группой пациентов с MDD и группой пациентов с BPD;

□□ достоверное различие между группой пациентов с MDD с группой пациентов с эпилепсией и здоровым контролем, $p < 0,05$

Для проверки полученных результатов были повторно набраны группа пациентов с депрессивным расстройством, диагнозом, подтвержденным лечащим врачом-психиатром, ($n=14$) и контрольная группа ($n=12$), которых тщательно подбирали по социально-демографическим и физиологическим параметрам. Критериями исключения для обеих групп явились: шизофрения; алкоголизм и наркомания в анамнезе жизни; серьезные неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, ушибы мозга, эпилепсия, и т.п.); эндокринные нарушения: сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы и прием тиреотропных препаратов/заместительной терапии; любое инвалидизирующее заболевание внутренних органов; значительные физические нагрузки накануне обследования, суточный и ночной графики работы, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период до госпитализации или перед участием в исследовании, наличие информационного согласия.

Пациенты с депрессивным расстройством и участники контрольной группы были сопоставимы по возрасту, полу и другим демографическим параметрам. Согласно опросу и клиничко-психологическим данным пациенты имели умеренную степень тяжести

депрессивного расстройства (средний балл по Шкале Гамильтона – 18.0±3.9), средняя длительность депрессивного эпизода составляла 2.1±1,7 года.

Сравнительная характеристика участников исследования приведена в таблице 3.

Таблица 3 - Основные демографические и психометрические параметры пациентов с депрессией и здоровых добровольцев

Показатель (M±SD)	Контроль	МДД	p-value
демографические показатели			
возраст	31.8±7.5	30.6±8.3	0.57
женщины/мужчины (%)	67/33	71/29	0,82
ИМТ	22.8±2.1	21.4±3.4	0.34
уровень дохода (ниже среднего/средний, %)	42/58	43/57	0.46
образование (среднее/высшее, %)	17/83	21/79	0.53
психометрические показатели			
BDI	3.5±2.7	23.9±9.7	0.00009
STAI _s	29.6±7.2	57.6±12.6	0.0002
STAI _t	37.4±4.2	53.9±12.7	0.007
HDRS		18.0±3.9	

MDD – major depressive disorder, HDRS – Hamilton Depression Rating Scale, BDI – Beck Depression Inventory, STAI_s – State Trait Anxiety Inventory state, STAI_t – State Trait Anxiety Inventory trait, ИМТ – индекс массы тела, M±SD - среднее значение ± стандартное отклонение

Для выделения и количественного анализа мЭВ сыворотки крови пациентов с депрессией и здоровых добровольцев использовали методы, описанные выше в разделе 3.2.

Физические и биохимические характеристики сывороточных мЭВ у пациентов с депрессивным расстройством и участников контрольной группы, оцененные различными методами, представлены в таблице 4.

Различий между сравниваемыми группами по размеру мЭВ, а также таким параметрам как количество белка на частицу и количество липидов на частицу выявлено не было. При этом концентрация выделенных сывороточных мЭВ, оцененное четырьмя разными методами (анализом траектории наночастиц, методом динамического светорассеивания, иммуноферментным анализом с антителами против тетраспанинов, определением суммарного количества везикулярного белка), была достоверно повышена у пациентов с депрессивным расстройством.

Таблица 4 - Параметры мЭВ, выделенных из сыворотки крови и сопутствующие лабораторные показатели крови пациентов с депрессией и здоровых добровольцев

Показатель (M±SD)	Контроль	МДД	p-value
гемограмма			
лейкоциты (10 ³ /mL)	5.8±1.0	7.0±2.2	0.31
нейтрофилы%	59.3±6.6	51.8±10.3	0.09
лимфоциты %	28.9±5.0	36.9±8.3	0.01
моноциты %	7.9±1.6	8.0±1.8	0.91
тромбоциты (10 ³ /mL)	241.7±55.5	222.2±36.0	0,86
эритроциты (10 ⁶ /mL)	4.8±0.5	4.7±0.6	0.83
ростовые факторы и цитокины			
BDNF, ng/mL	24.1±6.8	20.8±5.7	0.15

CNTF, Pg/mL	3.2±2.0	6.3±4.2	0.02
интерлейкин-6, pg/mL	2.7±1.2	3.4±2.5	0.61
Показатель(M±SD)	Контроль	МДД	p-value
параметры выделенных мЭВ			
размер частиц (nm)	97.9±5.5	99.6±6.0	0.42
количество белка/частицу (ug/mL)	6.0±2.4	5.8±3.7	0.70
количество липидов/частицу (ug/mL)	63.0±27.5	60.7±25.0	0.94
количество импульсов рассеянного света/пробу, (анализ динамического светорассеивания, kcps)	240.7±189.9	423.1±192.3	0.046
количество частиц/кадр (анализ траекторий наночастиц)	25.0±11.5	31.5±7.0	0.050
количество мЭВ в 100 µL сыворотки крови x10 ⁹	1.5±0.5	2.5±0.9	0.023
общая концентрация мЭВ белка (ug /mL)	0.007±0.006	0.013±0.005	0.034

MDD – major depressive disorder

M±SD - среднее значение ± стандартное отклонение

Ранее было показано, что повышенный выброс мЭВ характерен для клеток с нарушением клеточного цикла (стареющих клеток или клеток опухолей) [7]. Поэтому выделенные фракции сывороточных мЭВ пациентов с депрессией и участников контрольной группы были сопоставлены по концентрации белков теплового шока (HSP70) и ферментов, задействованных в процессах апоптоза (прокаспазы-3, протеинкиназы АКТ и ее двух фосфорилированных форм). Полученные результаты показали отсутствие достоверных отличий по этим группам ферментов в выделенных фракциях мЭВ у пациентов с депрессивным расстройством и здоровых испытуемых.

Выявленное увеличенное количество мЭВ в сыворотке крови у пациентов с депрессивным расстройством имело место на фоне достоверно выраженного относительного лимфоцитоза и достоверно увеличенного количества цитокина CNTF, ассоциированного с дисрегуляторными процессами, происходящих в микроглии и астроглии [68, 69]. Можно предположить, что повышенный уровень мЭВ у пациентов с депрессией также может быть связан с клеточно-опосредованной иммунной активацией, которая, по мнению многих исследователей, является одним из физиологических проявлений этой группы заболеваний [70].

При подсчете количества мЭВ методом динамического светорассеивания была найдена положительная корреляция уровня мЭВ с концентрацией CNTF сыворотки крови (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,602, $p=0,008$), что отчасти подтверждает высказанное выше предположение.

3.2 Протокол выделения мЭВ из сыворотки крови методами преципитации полиэтиленгликолем (ПЭГ) и гель-фильтрацией с последующей сравнительной количественной оценкой полученных фракций мЭВ

Еще одним относительно простым и доступным методом выделения мЭВ, приемлемым для использования в клинических условиях, является метод преципитации при помощи ПЭГ. Поэтому следующим этапом исследования была апробация указанного метода выделения мЭВ с одновременным сопоставлением характеристик фракций мЭВ, выделенных этим методом с соответствующими характеристиками мЭВ, выделенными

гель-фильтрацией для оценки и учета преимуществ и недостатков разных способов выделения.

3.2.1 Характеристика участников исследования

Апробация протокола выделения мЭВ преципитацией ПЭГ и гель-фильтрацией с последующей сравнительной оценкой выделенных фракций мЭВ была проведена на сплошной выборке, состоящей из 46 пациентов, проходивших курс лечения в НПЦ психоневрологии и 10 здоровых добровольцев старше 18 лет без выявленных соматических отклонений. Пациенты были разделены на условные группы согласно выставленным диагнозам и рекомендациям врача-психиатра.

Группа с депрессией (MDD) состояла из пациентов с униполярной депрессией первый эпизод F32.1-F32.3, с рекуррентным депрессивным расстройством F33.1-F33.2. Отдельную группу составили пациенты с биполярным аффективным расстройством (F31.3, F31.4). Диагноз депрессивного расстройства был поставлен на основании заключения психиатра. Симптомы депрессии были количественно оценены с использованием валидированной русской версии [59] BDI-II [60]. Оценка гипоманиакальных симптомов проводилась в соответствии с валидированной русской версией [61] HCL 32 [62]. Пациенты с фокальной эпилепсией (G40.1, G40.2, G40.9) были разделены на две группы. Группа из 9 человек состояла из пациентов, не имеющих выраженных психических отклонений (EPI w/o MDD), группа из 8 человек, которые кроме основного заболевания имели сопутствующий диагноз депрессивного расстройства F32.1, F32.2, F33.1, F33.2 5 (EPI w MDD). Диагноз фокальной эпилепсии был поставлен в соответствии с классификацией Международной лиги по борьбе с эпилепсией (ILAE) [63]. Пациенты с психогенными неэпилептическими приступами (F44.5), имеющие сопутствующий диагноз депрессивного расстройства F32.1, F32.2, F33.1, F33.2 были также выделены в отдельную группу. Когнитивное снижение оценивалось по шкале MMSE [70]. Демографическая информация включала возраст, пол, уровень образования, экономический статус и индекс массы тела (ИМТ). Исследование было одобрено местным комитетом по этике, все пациенты подписали информированное согласие до начала исследования. Характеристики участников исследования приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Сравнительная характеристика участников исследования

Показатель (M±SD)	Контроль n=10	MDD n=20	EPI w/o MDD n=9	EPI w MDD n=8	PNS n=5	BD n=7
демографические показатели						
Возраст (min-max)	28,4 (24-39)	33,4 (19-59)	33,7 (20-56)	37 (22-52)	31,2 (18-50)	27,9 (21-48)
ИМТ(M±SD)	22.3±2.4	23.2±4.0	25.5±5.8	23.8±2.9	21.1±2.2	24.2±9.7
мужчины/женщины	4/6	3/17	4/5	2/6	1/4	1/6
длительность заболевания, годы		6,6 (0.5-20)	14,9 (3-36)	11,1(3-26)	9.6 (3-32)	8,3 (2-17)
психометрические показатели						
BDI-11, (M±SD)		33.8±10.4	5.5±3.3□	19.9±6.9□	34.0±7.5	34.7±10.5
MMSE, M±SD		28.5±1.4	27.4±1.5	28.0±1.3	29.0±1.2	28.7±1.8

MDD – major depressive disorder, EPI w/o MDD – epilepsy without major depressive disorder, EPI w MDD – epilepsy with major depressive disorder, BD – bipolar disorder, PNS - psychogenic nonepileptic seizures, BDI-11 – Beck Depression Inventory MMSE – Mini-Mental-State-Examination, M±SD - среднее значение ± стандартное отклонение, $p < 0,05$

3.2.2 Методики выделения и оценки мЭВ

Получение и обработку проб сыворотки крови, предназначенных для выделения мЭВ, проводили по методикам, изложенным в разделе 3.2.1.

Выделение мЭВ из сыворотки крови гель-фильтрацией проводили по методу, указанному в 3.1.3.

Выделение мЭВ из сыворотки крови с помощью ПЭГ 6000, проводили по следующей методике. Пробы сыворотки крови очищали от остатков клеток и высокомолекулярных агрегатов центрифугированием при 4°C в течение 30 минут при 10 000 g. К аликвоте образца объемом 500 µL добавляли равный объем 6% PEG 6000, интенсивно перемешивали и оставляли на 30 минут на льду. Затем образцы центрифугировали при 4°C в течение 30 минут при 1 500 g. Осадок однократно промывали 100 µL PBS и растворяли в 100 µL PBS при интенсивном перемешивании. Полученную грубую фракцию мЭВ замораживали на -80°C.

Для оценки количества выделенных мЭВ использовали метод динамического светорассеяния (раздел 3.1.5).

Определение общей концентрации липидов из выделенных мЭВ оценивали по схеме, изложенной в разделе 3.1.8.

Статистическую обработку результатов проводили, как указано в разделе 3.1.9

3.2.3 Результаты сравнения двух методов выделения мЭВ

Результаты сравнения фракций мЭВ, выделенных методами гель-фильтрации и преципитации ПЭГ представлены на рисунке 2.

На рисунке 2(А) показана корреляция между количеством мЭВ в образцах, выделенных ПЭГ, и в образцах, выделенных гель-фильтрацией (коэффициент корреляции $r = 0,52$ (95% доверительный интервал 0,28-0,69, $p < 0,0001$), где каждая точка представляет отдельного пациента. Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная - 95% доверительный интервал. Коэффициент детерминации для такой аппроксимации составил 0,44, что является достаточно хорошим значением. Наилучшая аппроксимация представляет собой линейное приближение, слегка смещенное вверх от оси X, так что фракция мЭВ после выделения с ПЭГ всегда имела более высокие показатели по сравнению с фракцией мЭВ, изолированной методом гель-фильтрации. Коэффициент наклона этой прямой линии превышает единицу, что также указывает, что методом преципитации с ПЭГ выделялось большее количество частиц по сравнению с соответствующими показателями после гель-фильтрации. Тем не менее, между двумя методами выделения мЭВ была обнаружена значимая корреляция, что может указывать на то, что фракции мЭВ, выделенные обоими способами имеют сходные показатели по количеству и по составу.

Была проверена взаимосвязь между концентрацией липидов во фракции мЭВ с их количеством в выделенных образцах мЭВ, оцененных методом динамического рассеяния света. Результаты показаны на рисунке 2(Б), где каждая точка представляет отдельного пациента. Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная - 95% доверительный интервал. Коэффициент детерминации для этого приближения составил

0,66, что является достаточно высоким значением. Была обнаружена значимая корреляция между количеством частиц и концентрацией липидов в образцах $r=0,84$ (95% доверительный интервал 0,75-0,90, $p<0,0001$), что свидетельствует о том, что все изолированные частицы имели одинаковое содержание липидов и, вероятно, относятся к типам, сходным по липидной композиции.

Полученные данные свидетельствуют о том, что использованные методы выделения: при помощи гель-фильтрации и посредством преципитации ПЭГ приводили к сходным результатам при оценке количества частиц в образцах мЭВ (рисунок 2(А)). Поэтому в ряде случаев эти методы могут быть взаимозаменяемы. Полученные данные о корреляции количества выделенных мЭВ с концентрацией липидов (рисунок 2(Б)), могут указывать на то, что выделенные мЭВ имеют сходный липидный состав.

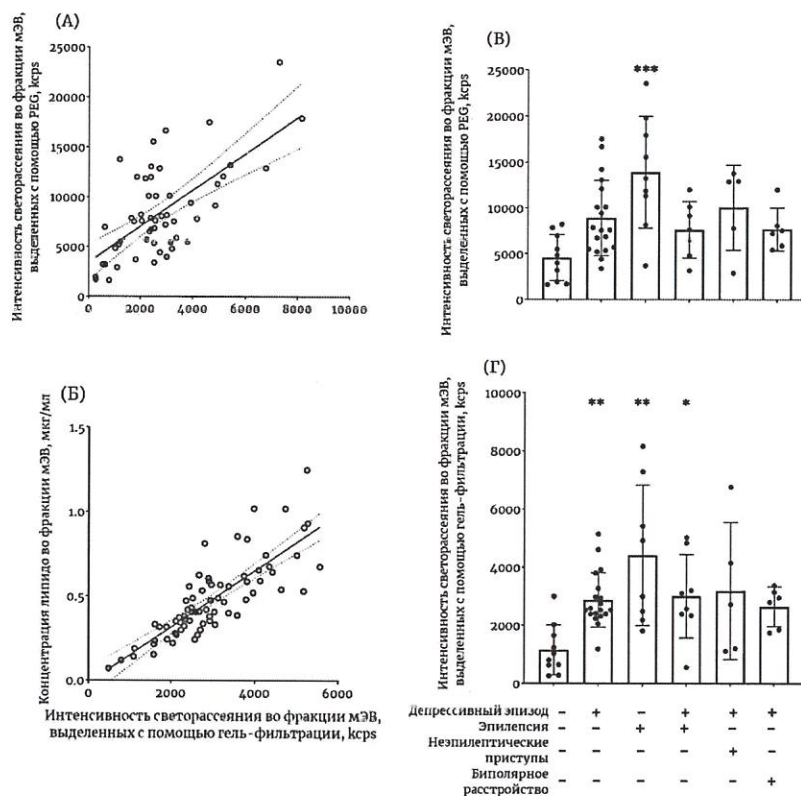


Рисунок 2 - Сравнительная оценка фракций мЭВ, выделенных разными методами.

А) корреляция между количеством частиц в образцах, выделенных ПЭГ, и в образцах, выделенных гель-фильтрацией; Б) корреляция между количеством частиц в образцах, выделенных гель-фильтрацией, и концентрацией липидов в этих образцах; В) количество частиц из сыворотки крови пациентов с различным диагнозом, выделенных методом преципитации ПЭГ; Г) количество частиц из сыворотки крови пациентов с различным диагнозом, выделенных методом гель-фильтрации. Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная 95% доверительный интервал. Ксрс - тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света)

□□□ достоверное различие между группой пациентов с эпилепсией и контролем; □□ достоверное различие между группой пациентов с эпилепсией и группой пациентов с депрессией с контролем, $p<0,05$

На рисунке 2(В) показаны данные по количеству мЭВ, выделенных методом преципитации ПЭГ из сыворотки крови пациентов с различным диагнозом (ANOVA H (5, 56)=16,45, p=0,006). На рисунке 2 (Г) представлены данные по количеству мЭВ, выделенных методом гель-фильтрации из сыворотки крови пациентов с различным диагнозом (ANOVA H(5, 56)=16,67, p=0,005).

При сравнительном анализе количества мЭВ, выделенных из сыворотки крови пациентов разных групп и здоровых добровольцев, оцененных методом динамического рассеяния света, было обнаружено их достоверное повышение у пациентов с униполярной депрессией и фокальной эпилепсией. При оценке мЭВ, выделенных при помощи разных методов, а именно: преципитацией ПЭГ (рисунок 2(В)) и гель-фильтрацией (рисунок 2(Г)) результаты были схожи.

Метод выделения при помощи гель-фильтрация оказался более чувствительным в выявлении различий между группами. При анализе фракции мЭВ, выделенных этим методом, в сыворотке крови больных депрессией или депрессией с фокальной эпилепсией и фокальной эпилепсией концентрация частиц была достоверно повышена относительно контрольной группы (рисунок 2(Г)). При количественной оценке мЭВ, выделенных при помощи ПЭГ, их достоверно повышенное количество по сравнению с контрольной группой выявлялось только у пациентов с эпилепсией (рисунок 2(В)).

Для выявления возможных связей повышенного уровня мЭВ, выделенных из сыворотки крови пациентов, был проведен корреляционный анализ между концентрацией мЭВ и тяжестью симптомов депрессии (рисунок 3А), когнитивным уровнем (рисунок 3Б), продолжительностью заболевания (рисунок 3В), возрастом пациентов (рисунок 3Г).

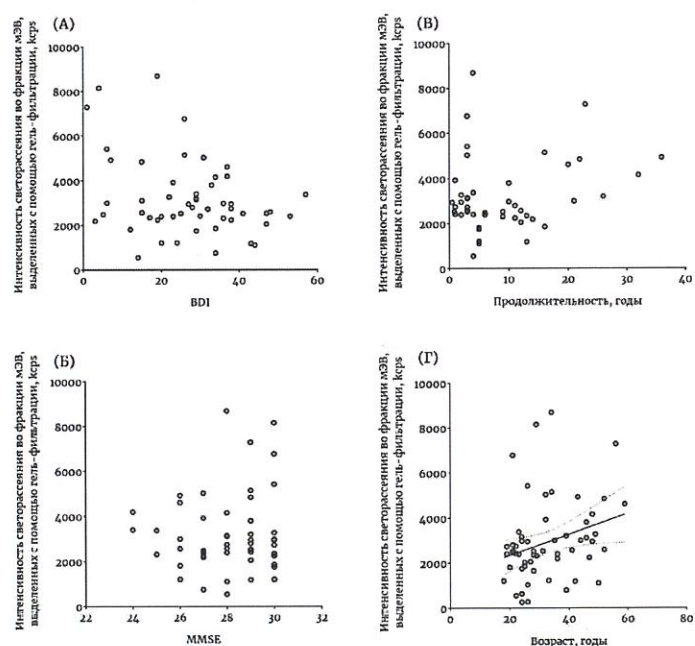


Рисунок 3 – корреляционный анализ количества мЭВ из сыворотки крови с клиническими показателями пациентов.

А) корреляция между количеством мЭВ сыворотки крови с показателями BDI; Б) корреляция между количеством мЭВ из сыворотки крови с показателями MMSE, В) корреляция между количеством мЭВ из сыворотки крови с длительностью заболевания (годы); Г) корреляция между количеством мЭВ из сыворотки крови с возрастом. Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная 95% доверительный

интервал. MMSE – Mini-Mental-State-Examination, – Beck Depression Inventory, кcps - тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света)

Ни одной значимой корреляции выявлено не было. Была обнаружена лишь слабая связь между концентрацией мЭВ и возрастом пациентов (рисунок 3Г) с коэффициентом корреляции $r=0,32$ (95% доверительный интервал составлял 0,06-0,54, $p<0,05$) и коэффициентом определения $R^2=0,08$.

В предыдущих исследованиях было показано, что концентрация мЭВ, выделенных методом гель-фильтрации увеличивается в крови пациентов с депрессией [16]. Мы полагаем, что это увеличение связано с хорошо известной активацией иммунной системы при депрессии [69,71]. Есть данные, что иммунная система может регулировать различные функции организма с помощью мЭВ [7]. Самое предварительное исследование предполагает, что мЭВ в крови пациентов с депрессией содержат миРНК, способные регулировать функцию иммунной системы [24]. Приведенные исследования не касаются абсолютного количества мЭВ в крови. Но мы разделяем основную идею авторов цитируемых статей о том, мЭВ в крови могут принимать активное участие в регуляции нейровоспаления при депрессивном расстройстве. Состояние мЭВ при эпилепсии в настоящее время неясно. Получены предварительные данные о количественных изменениях экзосомального белка в модели мышинной и человеческой эпилепсии [72], но говорить о диагностической ценности этих результатов пока преждевременно. Одной из возможных функций мЭВ при эпилептических припадках также может быть участие в регуляции воспаления [73]. Есть основания полагать, что пути активации иммунной системы с участием мЭВ при депрессии и эпилепсии могут иметь общие закономерности, но для проверки этого предположения необходимы разносторонние исследованиями состава фракций мЭВ, циркулирующих в биологических жидкостях, включая оценку их липидного профиля. При этом для биохимического анализа мЭВ желательно использовать стандартные методики определения, доступные для исполнения в условиях медицинских учреждений. Поэтому следующей задачей исследования была разработка протокола выделения мЭВ из сыворотки крови, позволяющая выполнять такого рода биохимические анализы на базе клинично-диагностических лабораторий (КДЛ) медицинских учреждений и его апробация с использованием стандартных методик для определения холестерина и триглицеридов, используемых в рутинной лабораторной практике.

4 ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ МАЛЫХ ЭВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА

4.1 Протокол выделения мЭВ из сыворотки крови, повышающий их количество в пробе для последующего липидного анализа

При анализе общей фракции липидов из мЭВ, выделенных методом, указанным в разделе 3.1, было обнаружено, что количество липидов на частицу у пациентов с депрессией достоверно не отличалось от показателей здоровых добровольцев (таблица 4, рисунок 4). Достоверно повышенное количество липидов на частицу среди исследованных групп оказалось только у пациентов с эпилепсией (рисунок 4).

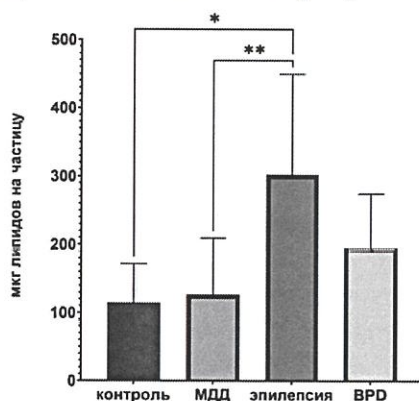


Рисунок 4 - Повышенное количество липидов на частицу, выявленное у пациентов с эпилепсией по сравнению с пациентами с депрессией и здоровым контролем.

MDD – major depressive disorder, BPD – borderline personality disorder

□ достоверное различие между группой пациентов с эпилепсией и контролем; □□ достоверное отличие между группой пациентов с эпилепсией и MDD, $p < 0,005$

Попытка провести развернутый анализ липидного профиля фракции мЭВ, выделенной только гель-фильтрацией, оказалась неуспешной. Методы выделения мЭВ, представленные в разделах 3.1 и 3.2, хорошо зарекомендовали себя для оценки количественных характеристик мЭВ, но оказались недостаточно чувствительны для развернутого анализа липидных фракций, входящих в состав мЭВ, выполняемых с помощью коммерческих наборов для измерения концентрации триглицеридов, холестерина и его фракций.

Чтобы получить возможность анализировать липидный профиль мЭВ с помощью указанных наборов, потребовалась доработка и усовершенствование метода выделения мЭВ с целью повышения количественного выхода мЭВ и их дополнительного очищения.

Использование комбинации двух ранее представленных методов выделения мЭВ: преципитации с помощью ПЭГ 6000 и последующей доочистки полученной фракции гель-фильтрацией на колонке с Sepharose CL-2B дало желаемый результат. В пробах мЭВ, полученных комбинацией методов, удалось без дополнительных процедур измерять концентрацию холестерина и триглицеридов с помощью доступных коммерческих наборов. В экспериментах были использованы фосфатно-солевой буфер (PBS, в таблетках, Биолот, Россия), PEG 6000 (Fluka, Германия), Sepharose CL-2B (GE Healthcare, США). Все растворы готовили на дважды деионизованной воде сопротивлением 18,2 МОм*см.

4.1.1 Характеристика участников исследования

В апробации метода приняли участие 27 человек в возрасте 18-45 лет: 11 пациентов НПЦ психоневрологии ДЗМ с депрессивным расстройством и 13 здоровых добровольцев. Пациенты с депрессивным расстройством имели диагнозы: тревожно-депрессивное расстройство F41.2, униполярная депрессия первый эпизод F32.1-F32.3, рекуррентное депрессивное расстройство F33.1-F33.2. На начальном этапе актуальная депрессия выявлялась при помощи шкалы депрессии Бека [60] для субъективной оценки уровня депрессии и шкалы тревоги Спилбергера для оценки уровней ситуативной и личностной тревоги [64]. В дальнейшем все пациенты, осматривались врачом-психиатром для подтверждения диагноза и исключения коморбидной психической патологии. Все участники исследования подписали информационное согласие. Критериями исключения для обеих групп явились: шизофрения; алкоголизм и наркомания в анамнезе жизни; серьезные неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, ушибы мозга, эпилепсия, и т.п.); эндокринные нарушения: сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы и прием тиреотропных препаратов/заместительной терапии; любое инвалидизирующее заболевание внутренних органов; выраженный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки накануне обследования, суточный и ночной графики работы, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период до госпитализации или перед участием в исследовании.

Демографическая информация включала возраст, пол, уровень образования, экономический статус, индекс массы тела (ИМТ) и не отличалась между группами.

Группа пациентов с депрессивным расстройством характеризовалась средним возрастом $34,3 \pm 10,4$ года, средним баллом по шкале Бека $19,3 \pm 6,5$, средним баллом по шкале Гамильтона $17,4 \pm 3,5$ и средней длительностью заболевания около 96 месяцев. Таким образом, группу пациентов, представленных в работе, можно охарактеризовать как людей среднего возраста с умеренно выраженной депрессией. Контрольная группа достоверно не отличалась от пациентов с депрессией по возрасту ($41,3 \pm 9,2$ года).

Получение, последующая обработка сыворотки крови были выполнены по методикам, изложенным в разделе 3.1.2, выделение фракции мЭВ из сыворотки крови проводилось при помощи ПЭГ (раздел 3.2.2), последующая доочистка фракции мЭВ была выполнена методом гель-фильтрации (раздел 3.1.3). Оценку количества мЭВ в образцах проводили с использованием метода рассеяния света (раздел 3.1. 5), статистический анализ был выполнен методами, изложенными в разделе 3.1.9.

4.1.2 Определение концентрации холестерина в выделенных образцах мЭВ

Определение концентрации холестерина в мЭВ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе ILab Aries (Италия) жидким монореагентом (BioSystems SA, Испания), состоящим из PIPES – 35 mmol/L, холат натрия – 0,5 mmol/L, фенол – 28 ммоль/л, холестеролэстераза – 0,2 U/mL, холестеролоксидаза – 0,1 U/mL, пероксидаза – 0,8 Ед/мл, 4-аминоантипирин – 0,5 mmol/L, рН - 7,0. Метод определения - холестеролоксидаза/пероксидаза, конечная точка. Предел обнаружения – 0,023 mmol/L, предел линейности 26 mmol/L.

4.1.3 Определение концентрации триглицеридов в выделенных образцах мЭВ

Определение концентрации триглицеридов в мЭВ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе ILab Aries (Италия) жидким монореагентом (BioSystems SA, Испания), состоящим из PIPES - 45 mmol/L, ацетат магния – 5 mmol/L, 4-хлорфенол – 6 mmol/L, липаза – 100 U/mL, глицеролкиназа – 1,5 U/mL, глицерол-3-фосфатоксидаза – 4 U/mL, пероксидаза – 0,8 U/mL, 4-аминоантипирин – 0,75 mmol/L, АТФ – 0,9 mmol/L, рН - 7,0. Метод определения - глицеролфосфатоксидаза/пероксидаза, конечная точка. Предел обнаружения – 0,05 mmol/L, предел линейности 6,78 mmol/L.

4.2 Оценка уровня триглицеридов и холестерина в выделенных образцах мЭВ

Выделенная фракция мЭВ была исследована по нескольким физическим и биохимическим показателям. В первую очередь, во фракции мЭВ было измерено число частиц методом динамического светорассеяния, описанный в разделе 3.1.5 (рисунок 5А). Результат значительно превосходил предел детекции метода и, в целом, воспроизводил ранее полученные результаты. Столь же воспроизводимым оказался и метод определения общей концентрации белков мЭВ по методу Бредфорда (3.1.7). Результаты представлены на рисунке 5Б. Результаты определения концентрации холестерина во фракции мЭВ представлены на рисунке. 5В.

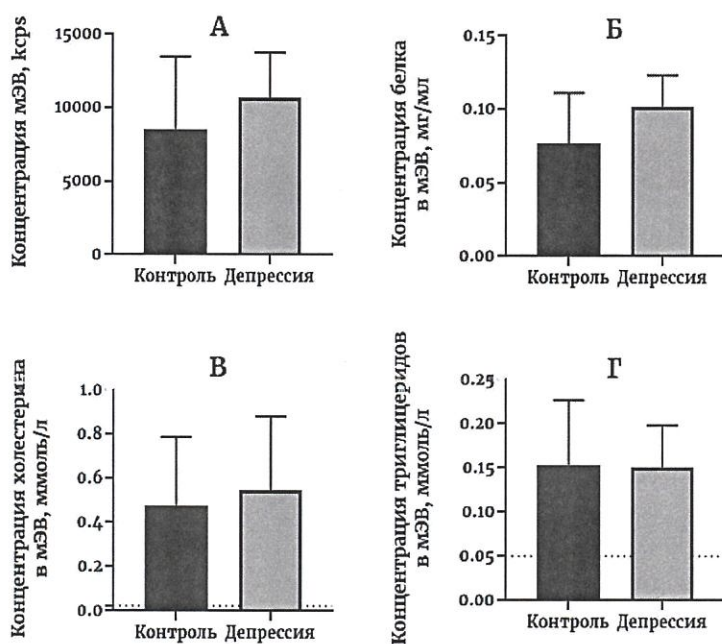


Рисунок 5 - Показатели в группах контроль и депрессия.

А) концентрация частиц по данным динамического светорассеяния; Б) концентрация белка в мЭВ, mg/mL; В) концентрация холестерина в мЭВ, пунктирной линией отмечен предел обнаружения, 0,023 mmol/L; Г) концентрация триглицеридов в мЭВ, пунктирной линией отмечен предел обнаружения, 0,05 mmol/L. Kcps - тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света)

Хорошо видно, что концентрация холестерина и в контрольной группе, и в группе пациентов с депрессией, существенно превосходит предел обнаружения, установленный для используемого метода производителем. Похожая ситуация обнаружена и для концентрации триглицеридов в мЭВ (рисунок 5Г). Превышение над пределом обнаружения в этом случае не столь явное как в случае с холестерином, но, тем не менее, заметное (рисунок 5Г).

При анализе корреляционных связей триглицеридов и холестерина сыворотки крови и выделенных из нее мЭВ были получены следующие результаты.

Корреляция по Спирмену количества мЭВ с уровнем триглицелидов в сыворотке крови, оцененная на выборке из 226 человек (54 мужчин и 172 женщин, средний возраст $38,3 \pm 15,1$) составила 0,44 ($p < 0,0001$) (рисунок 6).

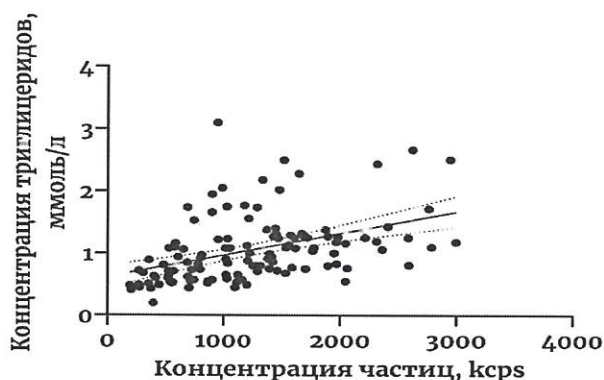


Рисунок 6 - Корреляция количества мЭВ с триглицеридами сыворотки крови.

Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная - 95% доверительный интервал. Ксрс - тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света)

Корреляция по Спирмену количества мЭВ с уровнем холестерина в сыворотке крови, оцененная на выборке из 226 человек (54 мужчин и 172 женщин, средний возраст $38,3 \pm 15,1$), составила 0,16 ($p < 0,005$), (рисунок7).

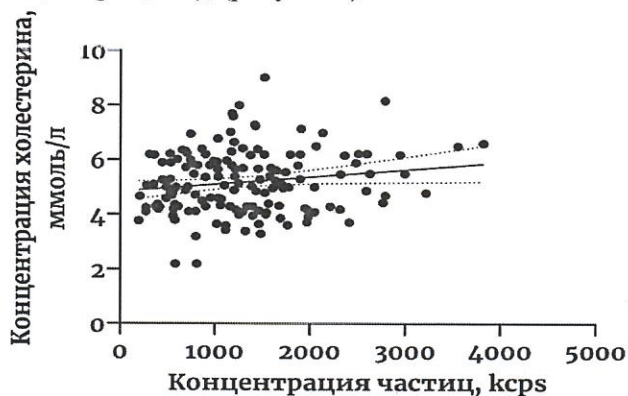


Рисунок 7 - Корреляция количества мЭВ с холестерином сыворотки крови.

Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная - 95% доверительный интервал. Ксрс - тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света)

При оценке корреляций количества частиц и концентрации холестерина и триглицеридов, выделенных из этих частиц, были получены следующие результаты (рисунок 8А и 8Б). В обоих случаях была обнаружена достоверная корреляция по Спирмену. Количество частиц и концентрация холестерина коррелируют с коэффициентом корреляции 0,52, $p < 0,0061$. Коэффициент детерминации в этом случае составил 0,348, что является довольно слабым показателем связи. Количество частиц и концентрация триглицеридов коррелируют с коэффициентом корреляции 0,72, $p < 0,0001$. Коэффициент детерминации в этом случае составил 0,616, что является довольно высоким значением. На графиках (рис. 8А и 8Б) хорошо видны и линейность взаимосвязей количества частиц и концентрации холестерина или концентрации триглицеридов, и небольшой разброс значений вдоль прямой. Тест серий не выявил неслучайности отклонения от линейности в обоих случаях.



Рисунок 8 - Корреляции количество частиц с параметрами липидного профиля.

А) корреляции количества частиц с концентрацией холестерина в мЭВ и Б) корреляции количества частиц с концентрацией триглицеридов в мЭВ. Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная - 95% доверительный интервал. Ксрps - тысяча фотонов в секунду (количественная оценка частиц методом динамического рассеяния света)

Высокодостоверная корреляция между числом мЭВ и концентрациями холестерина (рисунок 8А) и триглицеридов (рисунок 8Б) указывает на то, что все выделяемые с помощью комбинации двух методов частицы однородны по составу и имеют одинаковое соотношение липидов в мембранах мЭВ. Это наблюдение косвенно свидетельствует о чистоте выделения фракции мЭВ и отсутствии в ее составе примеси липопротеинов. Присутствие липопротеинов должно было бы сильно увеличить долю липидов во фракции мЭВ, чего, согласно нашим результатам, не происходило.

Представленная комбинация двух методов выделения мЭВ позволяет провести измерения концентрации холестерина и триглицеридов во фракции мЭВ с помощью коммерчески доступных наборов, что существенно упрощает биохимический анализ мЭВ. Представленный способ выделения мЭВ позволяет в 3-5 раз повысить концентрацию частиц в пробе, что является, по-видимому, одним из факторов последующего успешного применения коммерческих наборов для количественного определения холестерина и триглицеридов. Однако необходимо отметить, что полученные результаты нельзя объяснить только 3-5-кратным увеличением концентрации мЭВ при выделении их представленным методом. Есть предположение, что в процессе выделения мЭВ указанным способом происходит дополнительная их очистка и избавление от компонентов,

мешающих определению холестерина в образцах. Таким образом, комбинация двух методов выделения позволяет получать не только более концентрированную фракцию мЭВ, но и более чистую. Если руководствоваться полученной концентрацией белка (рисунок 3Б), то степень обеднения примесными белками при комбинации двух методов выделения также удваивается. Разработанная новая схема выделения мЭВ, сочетающая в себе преимущества двух методов – преципитации ПЭГ и гель-фильтрации представляется эффективной для оценки качественного биохимического анализа мЭВ, в частности липидного профиля, поскольку предоставляет возможность применять коммерческие наборы, широко используемые в лабораторной практике медицинских учреждений. Каждый из описанных методов выделения мЭВ по отдельности хорошо охарактеризован и их совместное применение не предполагает никаких сложностей. При некотором непринципиальном увеличении времени выделения мЭВ происходит 3-5-кратное повышение их концентрации в пробе и избавление от части примесей. Предложенный комплексный метод выделения мЭВ открывает широкие возможности для его применения в клинической практике для качественного анализа состава мЭВ в условиях КДЛ с использованием стандартных методик и последующего использования полученной информации в лечебном процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования были разработаны протоколы выделения мЭВ для их последующего анализа, адаптированные для использования в клинической практике.

При количественной оценке мЭВ, выделенных с использованием разработанных протоколов, было обнаружено повышенное количество мЭВ в сыворотке крови пациентов с депрессивным расстройством и пациентов с эпилепсией.

Корреляционный анализ между концентрацией мЭВ и тяжестью симптомов депрессии, уровнем когнитивных функций, продолжительностью заболевания не выявил достоверных связей между указанными показателями. Слабая корреляция была выявлена между концентрацией сывороточных мЭВ и возрастом пациентов.

Гель-фильтрация оказалась более чувствительным методом по сравнению с преципитацией ПЭГ при выявлении количественных различий между фракциями мЭВ, сыворотки крови пациентов с различной нейropsychической патологией.

К наилучшим результатам привела комбинация двух методов выделения мЭВ (ПЭГ и гель-фильтрация), которая позволила получить более концентрированную и дополнительно очищенную фракцию мЭВ. Полученная таким способом фракция мЭВ оказалась пригодна для последующего биохимического анализа липидного профиля с использованием стандартных лабораторных методик, которые обычно используются в медицинских учреждениях.

Для оценки липидного профиля выделенных фракций мЭВ были опробованы общедоступные коммерческие наборы по определению концентрации холестерина и триглицеридов в сыворотке крови с использованием автоматического биохимического анализатора. Результаты свидетельствуют о том, что предложенный протокол выделения экстраклеточных везикул пригоден для последующего анализа их липидного состава в условиях КДЛ.

Разработанный и апробированный в клинике протокол выделения мЭВ из сыворотки крови и последующая оценка липидного профиля мЭВ общедоступными коммерческими наборами расширяет круг методик, позволяющих рутинным способом получить информацию о состоянии структур мозга у пациентов с нейropsychическими заболеваниями. Выполненный проект полностью соответствует направлению из стратегии ИГР «переход к персонализированной медицине и технологиям здоровьесбережения».

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании проведенного исследования и полученных результатов были выработаны следующие рекомендации.

1. Принимая во внимание значимость экстраклеточных везикул, циркулирующих в биологических жидкостях, как потенциальных источников информации о состоянии мозга, рекомендуется использовать их количественные и качественные характеристики в диагностике и мониторинге пациентов с психоневрологическими расстройствами.
2. Для проведения скрининговой и количественной оценки мЭВ, циркулирующих в сыворотке крови, рекомендуется применение протокола выделения мЭВ методом гель-фильтрации.
3. Для проведения биохимического анализа мЭВ, циркулирующих в сыворотке крови, рекомендуется использование протокола выделения мЭВ с комбинацией методов преципитации ПЭГ и гель-фильтрации, позволяющего осуществлять такой анализ общедоступными лабораторными методами.
4. Оценка липидного профиля мЭВ, выделенных комбинацией методов преципитации ПЭГ и гель-фильтрации, может быть выполнена с использованием коммерческих наборов для определения триглицеридов, холестерина и его фракций, предназначенных для использования в КДЛ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Uher, R., Major depressive disorder in DSM-5: implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV / R. Uher, J. L. Payne, B. Pavlova, R. H. Perlis // *Depression and Anxiety*. – 2014. – Vol. 31, № 6. – P. 459 - 471.
2. Gold, P.W. Clinical and Biochemical Manifestations of Depression: Relation to the Neurobiology of Stress / P.W Gold, R. Machado-Vieira, M.G. Pavlatou // *Neural Plasticity*. - 2015. - 2015:581976 .
3. Januar, V. Epigenetics and depressive disorders: a review of current progress and future directions / V. Januar, R. Saffery, J. Ryan // *International Journal of Epidemiology*. - 2015. – Vol.44, №4. - P. 1364 -1387.
4. Kuwano, N., Neuron-related blood inflammatory markers as an objective evaluation tool for major depressive disorder: An exploratory pilot case-control study / N. Kuwano, T. A. Kato, M. Mitsushashi, M. Sato-Kasai, N. Shimokawa, K. Hayakawa, M. Ohgidani, N. Sagata, H. Kubo, T. Sakurai, S. Kanba // *Journal of Affective Disorders*. - 2018. – Vol.240. - P. 88-98.
5. Levada, O.A., Poststroke Depression Biomarkers: A Narrative Review / O.A. Levada, A.S. Troyan // *Frontiers in Neurology*. - 2018. – Vol.16, №9. - P. 577.
6. Gururajan, A., Molecular biomarkers of depression / A. Gururajan , G. Clarke, T.G. Dinan, J.F. Cryan // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. - 2016. – Vol. 64, - P. 101-133.
7. Brites, D., Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation / D. Brites, A. Fernandes // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. - 2015. – Vol. 9. - P. 476.
8. Dean, J., The neurobiology of depression: An integrated view / J. Dean, M. Keshavan // *Asian Journal of Psychiatry*. - 2017. – Vol. 27. - P. 101-111.
9. Luarte, A., Astrocytes at the Hub of the Stress Response: Potential Modulation of Neurogenesis by miRNAs in Astrocyte-Derived Exosomes / A. Luarte, P. Cisternas, A. Caviedes, L. F. Batiz, C. Lafourcade, U. Wyneken, R. Henzi // *Stem Cells International*. - 2017. - 2017:1719050.
10. Sharma, P., Exosomes regulate neurogenesis and circuit assembly / P. Sharma, P. Mesci, C. Carroneu, D. R. McClatchy, L. Schiapparelli, J. R. Yates A. R. Muotri, H.T. Cline // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2019. – Vol. 116, № 32. - P.16086-16094.
11. Luarte, A., et al., Astrocyte-Derived Small Extracellular Vesicles Regulate Dendritic Complexity through miR-26a-5p Activity / A. Luarte, R. Henzi, A. Fernández, D. Gaete, P. Cisternas, M. Pizarro, L. F. Batiz, I. Villalobos, M. Masalleras, R. Vergara, M. Varas-Godoy, L. Abarzua-Catalan, R. Herrera-Molina, C. Lafourcade, U. Wyneken // *Cells*. - 2020. – Vol. 9, №4. – P. 930.
12. Frühbeis, C., Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion / C. Frühbeis, W. P. Kuo-Elsner, C. Müller, K. Barth, L. Peris, S. Tenzer, W. Möbius, H. B. Werner, K. A. Nave, D. Fröhlich, E. M. Krämer-Albers // *Plos Biology*. - 2020. – Vol. 18, №12. – P. 1211.
13. Gelle, T., BDNF and pro-BDNF in serum and exosomes in major depression: Evolution after antidepressant treatment / T. Gelle, R. A. Samey, B. Plansont, B. Bessette, M.O. Jauberteau-Marchan, F. Lalloué, M. Girard // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. - 2021. – Vol. 109. - 110229.
14. Wang, Y., Plasma exosomes from depression ameliorate inflammation-induced depressive-like behaviors via sigma-1 receptor delivery / Y. Wang, C. Gao, T. Gao, L. Zhao, S. Zhu, L. Guo // *Brain Behavior and Immunity*. - 2021. – Vol. 94. - P. 225-234.

15. Nasca, C., Insulin receptor substrate in brain-enriched exosomes in subjects with major depression: on the path of creation of biosignatures of central insulin resistance / C. Nasca, J. Dobbin, B. Bigio, K. Watson, P. de Angelis, M. Kautz, A. Cochran, A. A. Mathé, J.H. Kocsis, F. S. Lee, J. W. Murrough, B. S. McEwen, N. Rasgon // *Molecular Psychiatry*. - 2020. – Vol. 26, № 9. – P. 5140-5149.
16. Yakovlev, A.A., Elevated Levels of Serum Exosomes in Patients with Major Depressive Disorder / A. A. Yakovlev, T. A. Druzhkova, R. V. Nikolaev, V. E. Kuznetsova, S. K. Gruzdev, A. B. Guekht, N.V. Gulyaeva // *Neurochemical Journal*. - 2019. – Vol. 13, № 4. - P. 385-390.
17. Tavakolizadeh, J., MicroRNAs and exosomes in depression: Potential diagnostic biomarkers / J. Tavakolizadeh, K. Roshanaei, A. Salmaninejad, R. Yari, J. S. Nahand, H. K. Sarkarizi, S. M. Mousavi, R. Salarinia, M. Rahmati, S. F. Mousavi, R. Mokhtari, H. Mirzaei // *Journal of Cellular Biochemistry*. - 2018. – Vol. 119, № 5. - P. 3783-3797.
18. Pegtel, D.M., Exosomes / D.M. Pegtel, S.J. Gould // *Annual Review of Biochemistry*. – 2019. - Vol. 88. - p. 487-514.
19. Kalluri, R. The biology, function, and biomedical applications of exosomes / R. Kalluri, V.S. LeBleu // *Science*. - 2020. – Vol. 367, № 6478. - P. 640-645.
20. Banks, W.A., Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation / W. A Banks, P. Sharma, K. M. Bullock, K. M. Hansen, N. Ludwig, T. L. Whiteside // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. – Vol. 21, № 12. – P. 4407.
21. Shi, M., New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood / M. Shi, L. Sheng, T. Stewart, C. P. Zabetian, J. Zhang // *Progress in Neurobiology*. - 2019. Vol. 175. - P. 96-106.
22. Mustapic, M., Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes / M. Mustapic, E. Eitan, J. K. Werner Jr, S. T. Berkowitz, M. P. Lazaropoulos, J. Tran, E. J. Goetzl, D. Kapogiannis // *Frontiers in Neuroscience*. - 2017. – Vol. 11. – P. 278.
23. Camkurt, M.A., MicroRNA dysregulation in manic and euthymic patients with bipolar disorder / M. A. Camkurt, İ. F. Karababa, M. E. Erdal, S. B. Kandemir, Gabriel R. Fries, H. Bayazit, M. E. Ay, H. Kandemir, Ö. I. Ay, S. Coşkun, E. Çiçek, S. Selek // *Journal of Affective Disorders*. - 2020. – Vol. 261. - P. 84-90.
24. Zhang, Y., Differential exosomal microRNA profile in the serum of a patient with depression. / Y. Zhang, Y. Zhao, C. Tian, J. Wang // *European Journal of Psychiatry*. - 2018. – Vol. 32, № 3. - P. 105-112
25. Gruzdev, S.K., The Missing Link: How Exosomes and miRNAs can Help in Bridging Psychiatry and Molecular Biology in the Context of Depression, Bipolar Disorder and Schizophrenia / S. K. Gruzdev, A. A. Yakovlev, T. A. Druzhkova, A. B. Guekht, N. V. Gulyaeva // *Cellular and Molecular Neurobiology*. - 2019. – Vol. 39, № 6. - P. 729-750.
26. Belhadj, Z., A combined "eat me/don't eat me" strategy based on extracellular vesicles for anticancer nanomedicine / Z. Belhadj, B. He, H. Deng, S. Song, H. Zhang, X. Wang, W. Dai, Q. Zhang // *Journal of Extracellular Vesicles*. - 2020. – Vol. 9, № 1. – 1806444.
27. Kamerkar, S., Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer / S. Kamerkar, V. S. LeBleu, H. Sugimoto, S. Yang, C. F. Ruivo, S. A. Melo, J. J. Lee, R. Kalluri // *Nature*. - 2017. – Vol. 546, № 7659. - P. 498-503.
28. Tkach, M. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go / M. Tkach, C. Thery // *Cell*. - 2016. – Vol. 164, № 6. - P. 1226-1232.

29. Fiandaca, M.S., Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study / M. S. Fiandaca, D. Kapogiannis, M. Mapstone, A. Boxer, E. Eitan, J. B. Schwartz, E. L. Abner, R. C. Petersen, H. J. Federoff, B. L. Miller, E. J. Goetzl // *Alzheimers & Dementia*. - 2015. – Vol. 11, № 6. - P. 600-607.
30. Goetzl, E.J., Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease / E. J. Goetzl, A. Boxer, J. B. Schwartz, E. L. Abner, R. C. Petersen, B. L. Miller, D. Kapogiannis // *Neurology*. - 2015. – Vol. 85, № 1. – P. 40-47.
31. Goetzl, E.J., Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease / E. J. Goetzl, D. Kapogiannis, J. B. Schwartz, I. V. Lobach, L. Goetzl, E. L. Abner, G. A. Jicha, A. M. Karydas, A. Boxer, B. L. Miller // *Faseb Journal* - 2016. – Vol. 30, №12. - P. 4141-4148.
32. Goetzl, E.J., Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease / E. J. Goetzl, M. Mustapic, D. Kapogiannis, E. Eitan, I. V. Lobach, L. Goetzl, J. B. Schwartz, B. L. Miller // *Faseb Journal*, 2016. - Vol. 30, № 11 - P. 3853-3859.
33. Goetzl, E.J., Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease / E. J. Goetzl, E. L. Abner, G. A. Jicha, D. Kapogiannis, J. B. Schwartz // *Faseb Journal*. - 2018. – Vol. 32, № 2. P. 888-893.
34. Goetzl, E.J., High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease E. J. Goetzl, J. B. Schwartz, E. L. Abner, G. A. Jicha, D. Kapogiannis // *Annals of Neurology*. - 2018. – Vol. 83, № 3, P. 544-552.
35. Stuendl, A., Induction of alpha-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies A. Stuendl, M. Kunadt, N. Kruse, C. Bartels, W. Moebius, K. M. Danzer, B. Mollenhauer, A. Schneider // *Brain*. - 2016. – Vol. 139. P. 481-494.
36. Cerri, S., The Exosomal/Total alpha-Synuclein Ratio in Plasma Is Associated With Glucocerebrosidase Activity and Correlates With Measures of Disease Severity in PD Patients / S. Cerri, C. Ghezzi, M. Sampieri, F. Siani, M. Avenali, G. Dornini, R. Zangaglia, B. Minafra, F. Blandini // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. - 2018. – Vol. 12. - P.125.
37. Si, X.L., Central Nervous System-Derived Exosomal Alpha-Synuclein in Serum May Be a Biomarker in Parkinson's Disease / X. Si, J. Tian, Y. Chen, Y. Yan, J. Pu, B. Zhang // *Neuroscience*. - 2019. – Vol. 413. - P. 308-316.
38. Ardashirova, N.S., The Role of MicroRNA in the Pathogenesis and Diagnostics of Parkinson's Disease / N.S. Ardashirova, E.Y. Fedotova, S.N. Illarionov // *Neurochemical Journal*. - 2020. – Vol. 14, № 2. - P. 127-132.
39. Jiang, C., Serum neuronal exosomes predict and differentiate Parkinson's disease from atypical parkinsonism / C. Jiang, F. Hopfner, A. Katsikoudi, R. Hein, C. Catli, S. Evetts, Y. Huang, H. Wang, J. W. Ryder, G. Kuhlenbaumer, G. Deuschl, A. Padovani, D. Berg, B. Borroni, M. T. Hu, J. J. Davis, G. K. Tofaris // *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. - 2020. – Vol. 9, № 7. - P. 720-729.
40. Galazka, G., Multiple sclerosis. Serum-derived exosomes express myelin proteins / G. Galazka, M. P. Mycko, I. Selmaj, C. S. Raine, K.W. Selmaj // *Multiple Sclerosis Journal*. - 2018. – Vol. 24, № 4. - P. 449-458.
41. Sproviero, D., Pathological Proteins Are Transported by Extracellular Vesicles of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients / D. Sproviero, S. La Salvia, M. Giannini, V. Crippa, S. Gagliardi, S. Bernuzzi, L. Diamanti, M. Ceroni, O. Pansarasa, A. Poletti, C. Cereda // *Frontiers in Neuroscience*. - 2018. – Vol. 12. – P. 487.

42. Chen, Y., Increased Interleukin-6 Levels in the Astrocyte-Derived Exosomes of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients / Y. Chen, K. Xia, L. Chen // *Dongsheng FanFrontiers in Neuroscience*. - 2019. – Vol. 13. - P.574.
43. Ivanova, M.V., Exosomal Transport and Progression of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis / M. V. Ivanova, E. O. Chekanova, B. V. Belugin, I. L. Tutykhina, I. V. Dolzhikova, I. V. Zakroishchikova, A. V. Vasil'ev, M. N. Zakharova // *Neurochemical Journal*. - 2019. – Vol. 13, № 3 - P. 229-239.
44. Ivanova, M.V., Exosomal Angiogenin as a Potential Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis / M. V. Ivanova, E. O. Chekanova, B. V. Belugin, I. V. Dolzhikova, I. L. Tutykhina, M. N. Zakharova // *Neurochemical Journal*. - 2020. – Vol. 14, № 3. – P. 321-327.
45. Winston, C.N., Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile / C. N. Winston, E. J. Goetzl, J. C. Akers, B. S. Carter, E. M. Rockenstein, D. Galasko, E. Masliah, R. A. Rissman // *Alzheimers Dement (Amst)*. - 2016. – Vol. 7. – P. 67-72.
46. Fries, G.R., Preliminary investigation of peripheral extracellular vesicles' microRNAs in bipolar disorder / G. R. Fries, C. N. C. Lima, S. S. Valvassori, G. Zunta-Soares, J. C. Soares, J. Quevedo // *Journal of Affective Disorders*. - 2019. – Vol. 255. - P. 10-14.
47. Ceylan, D., Circulating exosomal microRNAs in bipolar disorder / D. Ceylan, K. U. Tufekci, P. Keskinoglu, S. Genc, A. Özdem // *Journal of Affective Disorders*. - 2020. – Vol. 262. - P. 99-107.
48. Ng, F., Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications / F. Ng, M. Berk, O. Dean, A. I. Bush // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. - 2008. – Vol. 11, № 6. - P. 851-876.
49. Maes, M., A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness / M. Maes, P. Galecki, Y. S. Chang, M. Berk // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. - 2011. – Vol. 35, № 3. - P. 676-692.
50. Lütjohann, D., Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients / D. Lütjohann, A. Papassotiropoulos, I. Björkhem, S. Locatelli, M. Bagli, R. D. Oehring, U. Schlegel, F. Jessen, M. L. Rao, K. von Bergmann, R. Heun // *Journal of Lipid Research*. - 2000. – Vol. 41, № 2. - P. 195-198.
51. Jow, G.M., Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia / C. M. Jow, T.T. Yang, C.L. Chen // *Journal of Affective Disorders*. - 2006. - Vol. 90, № 1. - P. 21-27.
52. Liu, T., A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. / T. Liu, S. Zhong, X. Liao, J. Chen, T. He, S. Lai, Y. Jia // *Plos One*. - 2015. - Vol. 10, № 10 - e0138904.
53. Sarchiapone, M., Cholesterol and serotonin indices in depressed and suicidal patients / M. Sarchiapone, G. Camardese, A. Roy, S. D. Casa, M. A. Satta, B. Gonzalez, J. Berman, S. De Risio // *Journal of Affective Disorders*. - 2001. - Vol. 62, № 3. - P. 217-219.
54. Lalovic, A., Investigation of completed suicide and genes involved in cholesterol metabolism / A. Lalovic, A. Sequeira, R. DeGuzman, N. Chawky, A. Lesage, M. Seguin, G. Turecki // *Journal of Affective Disorders*. - 2004. – Vol. 79, № 1-3. - P. 25-32.
55. Osteikoetxea, X., Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties / X. Osteikoetxea, A. Balogh, K. Szabó-Taylor, A. Németh, T. Géza Szabó, K. Pálóczi, B. Sódar, Á. Kittel, B. György, É. Pállinger, J. Matkó, E. I. Buzás // *Plos One*. - 2015. – Vol. 10, № 3.
56. Record, M., Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes / M. Record, K. Carayon, M. Poirot, S.

- Silvente-Poirot // *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. - 2014. – Vol. 1841, № 1. – P. 108-120.
57. Skotland, T., Thematic Review Series: Exosomes and Microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology / T. Skotland, N. P. Høessvik, K. Sandvig, A. Llorente // *Journal of Lipid Research*. - 2019. – Vol. 60, № 1. - P. 9-11.
 58. Liu, D.S.K., Size-Exclusion Chromatography as a Technique for the Investigation of Novel Extracellular Vesicles in Cancer / D. S. K. Liu, F. M. Upton, E. Rees, C. Limb, L. R. Jiao, J. Krell, A. E. Frampton // *Cancers*. - 2020. – Vol.12, № 11. - P. 31-56.
 59. Злобина М.В., Анализ опросников самооценки депрессии PHQ-9 и BDI-II / М. В. Злобина, О. Н. Первушина // *Reflexio*. - 2018. - Т. 11, № 1. - С. 83–98.
 60. Beck, A. T. Comparison of Beck Depression Inventories-IA and -II in psychiatric outpatients / A. T. Beck, R. A. Steer, R. Ball, W. F. Ranieri // *Journal of Personality Assessment*. - Vol. 67, № 3. - P. 588 -597.
 61. Mosolov, S. N., Validation of the Russian version of the Hypomania Checklist (HCL-32) for the detection of Bipolar II disorder in patients with a current diagnosis of recurrent depression / S. N. Mosolov, A. V. Ushkalova, E. G. Kostukova, A. A. Shafarenko, P. V. Alfimov, A. B. Kostyukova, J. Angst // *Journal of Affective Disorders*. – 2014. - Vol. 155. - P. 90-95.
 62. J. Angst, J., The HCL-32: Towards a self-assessment tool for hypomanic symptoms in outpatients / J. Angst, R. Adolfsson, F. Benazzi, A. Gamma, E. Hantouche, T. D. Meyer, P. Skeppar, E. Vieta, J. Scott // *Journal of Affective Disorders*. – 2005. - Vol. 88, №2, - P. 217-233.
 63. Scheffer I. E. , ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology / I. E. Scheffer, S. Berkovic, G. Capovilla, M. B. Connolly, Jacqueline French, Laura Guilhoto, Edouard Hirsch, Satish Jain, Gary W Mathern, S. L. Moshé, D. R. Nordli, E. Perucca, T. Tomson, S. Wiebe, Y. H. Zhang, S. M Zuberi // *Epilepsia*. – 2017ю - Vol. 58, № 4, - P. 512-521.
 64. Hanin, Y., A Russian Version of the State-Trait Anger Expression Inventory: Preliminary Data / Y. Hanin, C. D. Spielberger // *Series in Clinical & Community Psychology: Stress & Anxiety*. - 1983. - Vol. 2. - P. 15-26.
 65. Hamilton, M., A rating scale for depression // *J. Neurol.Neurosurg.Psychiatry*. - 1960. - Vol. 23. - P. 56-62.
 66. Witwer, K.W., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. / K.W Witwer, E. I. Buzás, L. T. Bemis, A. Bora, C. Lässer, J. Lötvall, E. N. Nolte-'t Hoen, M. G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Théry, M. H. Wauben, F. Hochberg // *Journal of Extracellular Vesicles*. - 2013. – Vol.2, №1. - P. 20360.
 67. Gamez-Valero, A., Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. / A. Gámez-Valero, M. Monguió-Tortajada, L. Carreras-Planella, M. la Franquesa, K. Beyer, F. E. Borràs // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 33641.
 68. Lin H.W., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) plus soluble CNTF receptor alpha increases cyclooxygenase-2 expression, PGE2 release and interferon-gamma-induced CD40 in murine microglia. / H. W. Lin, M. R. Jain, H. Li, S. W. Levison // *J.Neuroinflammation*. - 2009. – Vol, № 6. - P. 6-7.
 69. Yirmiya R., Depression as a microglial disease. / R. Yirmiya, N. Rimmerman, R. Reshef // *Trends Neurosci*. - 2015. - V.38. №10. - P. 637-658.

70. Folstein, M. F., Mini-mental state”: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. / M. F. Folstein, S. E. Folstein, P. R. McHugh // Journal of Psychiatric Research. – 1975. - Vol. 12, № 3, - P. 189-198.
71. Frühbeis, C. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. / C. Frühbeis, D. Fröhlich, W. P. Kuo, E. M. Krämer-Albers // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2013. - Vol.7, - P. 182.
72. Lin, Z. J. Serum Exosomal Proteins F9 and TSP-1 as Potential Diagnostic Biomarkers for Newly Diagnosed Epilepsy. / Z. Lin, Y. Gu, R. Zhou, M. Wang, Y. Guo, Y. Chen, J. Ma, F. Xiao¹, X. Wang, X. Tian // Frontiers in Neuroscience. – 2020. - Vol. 14, - P. 737.
73. Gao X.Y., CircHivep2 contributes to microglia activation and inflammation via miR-181a-5p/SOCS2 signalling in mice with kainic acid-induced epileptic seizures / G. Xiaoying, M.Guo, L. Jie, Z. Yanmei, C. Ying, S. Shengjie, G. Haiyan, S. Feixiang², Qi Sihua, S Jiahang // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2020. – Vol. 24, №22. – P. 12980-12993.

Составители:

**Яковлев Александр Александрович
Дружкова Татьяна Александровна
Лазарева Наталья Александровна
Моисеева Юлия Владимировна
Зинчук Михаил Сергеевич
Гехт Алла Борисовна
Гуляева Наталия Валерьевна**

**ВЫДЕЛЕНИЕ МАЛЫХ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ СЫВОРОТКИ
КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДЕПРЕССИЕЙ, ОЦЕНКА ИХ КОЛИЧЕСТВА И
ЛИПИДНОГО СОСТАВА**

Методические рекомендации

ГБУЗ НПЦ им. З.П.Соловьева ДЗМ
115419, г. Москва, ул. Донская, д. 43