

ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА ЭКЗОСОМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ: ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ У ПАЦИЕНТОВ С ДЕПРЕССИВНЫМ РАССТРОЙСТВОМ

© 2019 г. А. А. Яковлев^{1,2}, Т. А. Дружкова^{1, *}, Р. В. Николаев¹, В. Е. Кузнецова¹,
С. К. Груздев³, А. Б. Гехт¹, Н. В. Гуляева^{1,2}

¹Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Медицинский институт РУДН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.01.2019 г.

После доработки 07.02.2019 г.

Принята к публикации 12.02.2019 г.

Экзосомы представляют собой везикулы эндоцитарной мембраны небольшого размера (30–100 нм), которые содержатся в мультивезикулярных органах в эндосомной системе и секретируются при слиянии мультивезикулярных телец с плазматической мембраной. Благодаря функции переносчиков специфических грузов, а также стабильности в биологических жидкостях, экзосомы все чаще рассматриваются как потенциальные биомаркеры различных заболеваний. Степень участия и функциональная значимость экзосом в патогенезе депрессии мало изучены. Разработка методов диагностики депрессивных расстройств, на основе анализа циркулирующих экзосом, несмотря на методологические трудности, связанные с их выделением и идентификацией, очень перспективна. Целью настоящего исследования было выделение из сыворотки крови и сравнительный анализ экзосом пациентов с депрессивным расстройством и здоровых добровольцев с применением различных методов оценки. Концентрация сывороточных экзосом у пациентов с депрессивным расстройством, оцененная методом динамического светорассеяния, анализом траектории наночастиц и иммуноферментным анализом была достоверно повышена по сравнению с показателями здоровых добровольцев. Обсуждается вопрос о возможной взаимосвязи повышенного уровня сывороточных экзосом с клеточно-опосредованной иммунной активацией, наблюдаемой при депрессии.

Ключевые слова: экзосомы, сыворотка крови, депрессивное расстройство, анализ траектории наночастиц, метод динамического светорассеяния, иммуноферментный анализ

DOI: 10.1134/S1027813319040046

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования указывают на то, что большинство клеток организма способны секретировать во внеклеточное пространство мембранные везикулы. Эти везикулы могут быть различного назначения, но, независимо от этого, все они объединены под общим названием экстраклеточных везикул. Известно, что во время созревания эндосом во внутриэндосомальном пространстве образуются интрапоминальные пузырьки, которые накапливаются в процессе превращения эндосом в мультивезикулярные тельца. Мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной, а образовавшиеся внутри этих телец везикулы размером 30–100 нм, получившие название экзосом поступают во внеклеточное про-

странство [1, 2]. Полость экзосом, ограниченная собственной мембраной, имеет цитоплазматическое происхождение, внутри могут находиться различные белки, включая ферменты, ростовые факторы, рецепторы, гормоны, а также липиды, нуклеиновые кислоты и низкомолекулярные метаболиты [3, 2]. Экзосомы сохраняют биохимический профиль клеток-продуцентов, переносят различные вещества и сигнальную информацию [1, 2, 4]. Благодаря функции переносчиков специфических грузов, экзосомы могут быть использованы, как индикаторы различных физиологических и патологических состояний организма. Дополнительные преимущества их применения в этом качестве обусловлены тем, что они не разрушаются во внеклеточной среде, присутствуют в биологических жидкостях в количествах, достаточных для их выделения и анализа [4–6], и не из-

* Адресат для корреспонденции: 115419 Россия, Москва, ул. Донская, д.43, тел. (495) 237-42-47, e-mail: druzhkova.tatiana@mail.ru.

меняют свои основные свойства после хранения при низких температурах [6].

В научных публикациях, посвященных исследованию экстраклеточных везикул, представлены многочисленные доказательства высокой функциональной значимости экзосом как транспортеров веществ и сигнальной информации при нейродегенеративных заболеваниях [7–9]. Исследование экзосом в ликворе и сыворотке крови по динамике связанных с ними специфических белков, медиаторов или нуклеиновых кислот, в определенной степени, позволяет судить о клеточных процессах, происходящих в центральной нервной системе (ЦНС) в норме и при патологии [1, 8, 9]. Показано, что патогенез заболевания может ускоряться или опосредоваться экзосомами и связанными с ними грузами [10].

Депрессивные расстройства являются гетерогенной группой заболеваний с разной степенью проявления и выраженности клинических и физиологических показателей [11]. Патогенез депрессии в значительной степени обусловлен комплексным нарушением нервной, эндокринной и иммунной регуляции организма, приводящим к снижению нейропластичности мозга, гормональному дисбалансу, нейровоспалению, эпигенетическим модификациям [12–16] и связан со сложными межклеточными взаимодействиями, как в самом мозге, так и за его пределами [17, 18]. Степень участия и функциональная значимость экзосом, задействованных в этих процессах при депрессии, мало изучены. Немногочисленные исследования, выполненные в этой области, посвящены, в основном, анализу экспрессии разных микроРНК, как потенциальных маркеров заболевания, которые переносятся экзосомами [19–22]. Разработка методов диагностики депрессивных расстройств на основе анализа циркулирующих экзосом, несмотря на методологические трудности, связанные с их выделением и идентификацией, представляется перспективной. Имеющаяся в настоящее время информация является недостаточной для понимания роли экзосомального компонента в межклеточном взаимодействии при депрессии и потенциальной возможности использования экзосом в диагностике заболевания. Это диктует необходимость получения дополнительных сведений о количественном и качественном изменении циркулирующих экзосом при депрессии.

Целью настоящего исследования было выделить из сыворотки крови фракции экстраклеточных везикул, соответствующих по размеру экзосомам, у людей, страдающих депрессивным расстройством, и у здоровых добровольцев и сравнить их, применяя различные методы оценки.

Необходимо отметить, что одной из серьезных проблем, затрудняющих практическое использование циркулирующих экзосом в диагностике

различных заболеваний, является отсутствие единого стандартизированного способа их выделения и идентификации. В основе существующих методов лежат особенности их физической (плотность, размер) или биохимической (специфические поверхностные белки или углеводы) структуры. При проведении настоящего исследования применяли методы как физической, так и биохимической оценки выделенных везикул, поскольку каждое отдельно взятое их качество представлялось недостаточным объективным критерием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Критерии отбора участников исследования. В пилотное исследование были включены 14 пациентов с депрессивным расстройством и 12 участников контрольной группы.

Критериями включения для пациентов явились: наличие установленного диагноза в рамках F41.2, F32, F33 МКБ-10, возраст от 18 до 45 лет, наличие письменного информированного согласия. Диагноз депрессивного расстройства для каждого пациента подтверждался лечащим врачом-психиатром. Критериями включения для контрольной группы явились: возраст от 18 до 45 лет и наличие письменного информированного согласия. 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 и индекс массы тела (ИМТ).

Количественная оценка симптомов депрессии и тревоги проводилась с использованием вопросников: “Шкала депрессии Бека” [23, 24] – для субъективной оценки уровня депрессии; “Шкала тревоги Спилбергера” в адаптации Ю.Л. Ханина – для оценки уровней ситуативной и личностной тревоги [25, 26]. Состояние пациентов также оценивалось по “Шкале депрессии Гамильтона” [27], заполняемой их лечащим врачом-психиатром.

Материал для исследования. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови у пациентов и участников контрольной группы проводили из локтевой вены в утренние

часы натошак. Известно, что на образование экстраклеточных везикул оказывает влияние множество факторов [28]. Поэтому процедура взятия крови и преаналитический этап подготовки проб были максимально стандартизированы. Для всех проб были соблюдены одинаковые условия, а именно: время (не более 30 мин) и способ забора крови; температура в помещении между взятием крови и центрифугированием (22–23°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа. У пациентов с депрессивным расстройством кровь брали до назначения терапии.

Определение лабораторных показателей крови.

Определение клинических, биохимических и гормональных параметров цельной крови и сыворотки крови проводили для оценки и учета базовых различий лабораторных показателей между пациентами с депрессивным расстройством и здоровыми добровольцами, а также для исключения из исследования людей в случае первичного выявления у них любых острых воспалительных процессов и гормональных нарушений. Клинический анализ крови проводили с использованием гематологического анализатора LH-500 (Beckman Coulter, США), биохимический анализ сыворотки крови — 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 Technilogy, США) по методикам производителя тест-систем.

Способ выделения экстраклеточных везикул, соответствующих по размеру экзосомам, из сыворотки крови. Пробы сыворотки крови получали и очищали от остатков клеток и высокомолекулярных комплексов последовательным центрифугированием при 4°C в течение 10 мин при 300 g, в течение 20 мин при 1200 g, в течение 30 мин при 10000 g.

Для выделения фракции экстраклеточных везикул, соответствующих по размеру экзосомам, был выбран и стандартизирован метод гель-фильтрации сыворотки крови с применением колонок, заполненных смолой Sepharose CL-2B (GE Healthcare, США). Колонку заполняли 10 мл смолы Sepharose CL-2B (GE Healthcare, США) и уравнивали фосфатным буфером (PBS). Предварительно цен-

трифугированную сыворотку крови наносили на колонку в объеме 500 мкл, после добавления пробы наносили 3.5 мл PBS, элюат отбрасывали. После этого наносили 1 мл PBS и собирали элюат для последующего анализа. Перед очередной пробой промывали колонку не менее чем 10 мл PBS [29].

Полученные после гель-фильтрации образцы анализировали несколькими способами.

Анализ траектории наночастиц. Анализ траекторий наночастиц проводили на приборе NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, 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 мл. Выделенные экзосомы разводили в 25 раз и производили три видеозаписи по 30 с 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 экзосом (Blur 5 × 5, Max. jump 12, Min. track steps 5), которые позволяли определять как размер частиц, так и их концентрацию.

Метод динамического светорассеяния. Динамическое светорассеяние частиц в образцах определяли на приборе Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical, Великобритания). В кварцевую кювету наливали 1 мл 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 с 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.

Иммуноферментный анализ. Иммуноферментный анализ сыворотки крови проводили, исполь-

зуя наборы EXO-Test (ELISA) (HansaBioMed, Эстония) предназначенные для количественного определения экзосом в плазме и сыворотке крови человека по протоколу производителя тест-системы (www.hansabiomed.eu) на автоматическом анализаторе ChemWell 2910(Combi) (Awareness Technology, США).

Определение общей концентрации белков выделенных экзосом. Аликвоты с экзосомами после гель-фильтрации сыворотки крови концентрировали с помощью высасывания 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 HidexSense (PerkinElmer, Финляндия). Калибровочную прямую строили по бычьему сывороточному альбумину в концентрации от 0.01 до 2 мг/мл.

Определение общей концентрации липидов выделенных экзосом. Пробирки на 1.5 мл предварительно обрабатывали 70 мкл хлороформа и инкубировали при постоянном перемешивании при 90°C 10 мин до полного испарения хлороформа. В эти пробирки добавляли по 50 мкл фракции экзосом, находящихся в PBS. К пробам добавляли 250 мкл 96% серной кислоты и инкубировали 20 мин при 90°C при постоянном помешивании. После инкубации пробы охлаждали до комнатной температуры, потом добавляли в лунки 96-луночного планшета по 220 мкл каждой пробы и по 110 мкл ванилинового реагента (0.2 мг/мл в 17% ортофосфорной кислоте). Инкубировали 10 минут при комнатной температуре, затем проводили измерение при 540 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра HidexSense (PerkinElmer, Финляндия). В качестве стандарта использовали раствор масла в хлороформе в концентрации до 2 мкг/мл.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA ver. 10, StatSoftInc. Результаты представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую значимость различий между группами определяли по критерию Манна–Уитни (для двух независимых выборок). Корреляционный анализ проводился с расчетом коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (r). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная характеристика групп участников исследования. Ранее было показано, что на образование экстраклеточных везикул может

оказывать влияние множество факторов, включая возраст, пол, режим дня, качество питания и др. [28]. Поэтому группы пациентов с депрессией и здоровыми добровольцами были тщательно подобраны и по средним демографическим показателям (возраст, ИМТ, процентное соотношение женщин и мужчин в группе, экономический и образовательный статус) достоверно не отличались. У всех испытуемых не было выявлено никаких острых воспалительных процессов и гормональных нарушений.

Согласно опросу и клинико-психологическим данным пациенты имели умеренную степень тяжести депрессивного расстройства (средний балл по Шкале Гамильтона — 18.0 ± 3.9 , средняя длительность депрессивного эпизода — 2.1 ± 1.7 года).

Биохимический анализ крови по параметрам липидного, углеводного обмена, основным группам ферментов и микроэлементов не выявил значимых различий между пациентами с депрессивным расстройством и здоровыми добровольцами.

По гормонам (пролактин, тестостерон, эстрадиол, кортизол) достоверных различий между сравниваемыми группами также не было, имело место лишь снижение на уровне тенденции сывороточной концентрации тиреотропного гормона у пациентов с депрессией ($p < 0.08$). Сравнительный клинический анализ клеток крови показал достоверно выраженный относительный лимфоцитоз и относительную нейтропению, выявленную на уровне тенденции в группе пациентов с депрессией по сравнению со здоровыми добровольцами (табл. 1).

При определении нейротрофических факторов и интерлейкина-6, было выявлено достоверно значимое повышение уровня CNTF у пациентов с депрессией по сравнению с участниками контрольной группы (табл. 1). CNTF, цитокин из семейства интерлейкина-6, ассоциируется с нейропротекцией при повреждении ЦНС и играет большую роль в дифференцировке глиальных клеток. Было показано, что CNTF оказывает защитное действие на разные группы нейронов, включая дофаминовые нейроны, ингибируя активацию микроглии, окислительный стресс и нейровоспаление [30, 31].

Сравнительная характеристика экзосом, выделенных из сыворотки крови пациентов с депрессивным расстройством и здоровых добровольцев. Оценка физических характеристик выделенных экстраклеточных везикул методами динамического светорассеяния и анализа траектории частиц показала, что их размер варьировал около 100 нм и достоверно не отличался у пациентов с депрессивным расстройством и здоровых добровольцев. Также не было выявлено различий между сравниваемыми группами по таким параметрам как количество белка на частицу и количество ли-

Таблица 1. Основные демографические, психометрические и лабораторные параметры пациентов с депрессией и здоровых добровольцев

Показатель ($M \pm SD$)	Контроль $n = 12$	MDD $n = 14$	p
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			
Шкала Бека	3.5 ± 2.7	23.9 ± 9.7	0.00009
Ситуативная тревога	29.6 ± 7.2	57.6 ± 12.6	0.0002
Личностная тревога	37.4 ± 4.2	53.9 ± 12.7	0.007
Состав клеток крови			
Лейкоциты, $10^3/\text{мл}$	5.8 ± 1.0	7.0 ± 2.2	0.31
Нейтрофилы, %	59.3 ± 6.6	51.8 ± 10.3	0.086
Лимфоциты, %	28.9 ± 5.0	36.9 ± 8.3	0.015
Моноциты, %	7.9 ± 1.6	8.0 ± 1.8	0.91
Тромбоциты, $10^3/\text{мл}$	241.7 ± 55.5	222.2 ± 36.0	0.86
Эритроциты, $10^6/\text{мл}$	4.8 ± 0.5	4.7 ± 0.6	0.83
Ростовые факторы и цитокины			
BDNF, нг/мл	24.1 ± 6.8	20.8 ± 5.7	0.15
CNTF, пг/мл	3.2 ± 2.0	6.3 ± 4.2	0.02
Интерлейкин-6, пг/мл	2.7 ± 1.2	3.4 ± 2.5	0.61

MDD – большое депрессивное расстройство (major depressive disorder).

пидов на частицу. При этом концентрация сывороточных экстраклеточных везикул, соответствующих по физическим параметрам экзосомам, оцененная вышеуказанными методами, была достоверно повышена у пациентов с депрессивным расстройством. Результаты проведенного иммуноферментного анализа сыворотки крови с антителами к экзосомальным поверхностным белкам – тетраспанинам подтвердили данные о повышенном содержании экзосом в сыворотке крови у пациентов с депрессивным расстройством по сравнению с контрольной группой. Общее количество белка, измеренное в экзосомальных фракциях сыворотки крови у пациентов с депрессией, также было достоверно повышено по сравнению с соответствующим показателем участников контрольной группы (табл. 2).

Известно, что преобладающая доля экзосом, присутствующих в сыворотке крови, происходит из клеток самой крови, экзосомальные фракции других клеток составляют лишь небольшую часть от общего числа [3, 29]. Выявленное увеличенное количество экзосом в сыворотке крови у пациентов с депрессивным расстройством имело место на фоне достоверно выраженного относительно лимфоцитоза и достоверно повышенной концентрации цитокина CNTF, ассоциированного с дисрегуляторными процессами, происходящих в

микроглии и астроглии [32]. Ранее было показано, что реактивная микроглия высвобождает экзосомы и микровезикулы, несущие провоспалительные цитокины, и может индуцировать и распространять воспалительные реакции в организме [33–38]. Можно предположить, что повышенный уровень экзосом в сыворотке крови у пациентов с депрессией связан с клеточно-опосредованной иммунной активацией, которая, по мнению многих исследователей, является одним из физиологических проявлений этой группы заболеваний [18, 33–36]. Число частиц, определяемое методом динамического светорассеяния положительно коррелировало с концентрацией CNTF (коэффициент корреляции Spearman составил 0.60, $p = 0.0008$), что косвенно может подтверждать высказанное выше предположение.

Также были найдены корреляции количества экзосом, оцененные разными методами, с длительностью депрессивного эпизода (при оценке физическими методами коэффициент корреляции Spearman составил 0.45, $p < 0.07$; при оценке иммуноферментным анализом 0.54, $p < 0.02$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании показано, что концентрация экзосом в сыворотке крови, оцененная разными

Таблица 2. Параметры экзосом, выделенных из сыворотки крови пациентов с депрессией и здоровых добровольцев

Показатель ($M \pm SD$)	Контроль	MDD	<i>p</i>
Размер частиц, нм	97.9 $\pm$ 5.5	99.6 $\pm$ 6.0	0.42
Количество белка/частицу, мкг/мл	6.0 $\pm$ 2.4	5.8 $\pm$ 3.7	0.70
Количество липидов/частицу, мкг/мл	63.0 $\pm$ 27.5	60.7 $\pm$ 25.0	0.94
Количество импульсов рассеянного света/пробу, (анализ динамического светорассеивания, kcps)	240.7 $\pm$ 189.9	423.1 $\pm$ 192.3	0.046
Количество частиц/кадр (анализ траекторий наночастиц)	25.0 $\pm$ 11.5	31.5 $\pm$ 7.0	0.050
Количество экзосом в 100 мкл сыворотки крови $\times 10^9$ (EXO-Test, ELISA)	1.5 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.9	0.023
Общая концентрация экзосомального белка, мкг/мл	0.007 $\pm$ 0.006	0.013 $\pm$ 0.005	0.034

MDD – большое депрессивное расстройство (major depressive disorder).

методами, была достоверно повышена у пациентов с умеренной степенью тяжести депрессии по сравнению с участниками контрольной группы. Полученные результаты являются предварительными и требуют дальнейшего изучения. Для выявления потенциальных закономерностей необходимо проверить полученные данные на более представительной выборке пациентов с депрессией, включающей участников с разной степенью тяжести заболевания, в том числе, пациентов с рецидивирующим течением депрессивного расстройства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-01079-а.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность представителям Malvern Panalytical Ltd в РФ С.Л. Васину и Е.О. Дуплякину за помощь в разработке оптических методов регистрации экзосом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Colombo M., Raposo G., Théry C. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2014. V. 30. № 1. P. 255–289.
- Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Al Saffar H., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilamkurti N., Gangoda L., Mathivanan S. // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. № 4. P. 688–692.
- Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1820. P. 940–948.
- Tkach M., Théry C. // Cell. 2016. V. 164. № 6. P. 1226–1232.
- Baranyai T., Herczeg K., Onódi Z., Voszka I., Módos K., Marton N., Nagy G., Mäger I., Wood M.J., El Andaloussi S., Pálincás Z., Kumar V., Nagy P., Kittel Á., Buzás E.I., Ferdinandy P., Giricz Z. // PLoS One. 2015. V. 21. P. 10–12.
- Muller L., Hong C.S., Stolz D.B., Watkins S.C., Whiteside T.L. // J. Immunol. Methods. 2014. V. 411. P. 55–65.
- Candelario K.M., Steindler D.A. // Trends Mol. Med. 2014. V. 20. № 7. P. 368–374.
- Holm M.M., Kaiser J., Schwab M.E. // Trends Neurosci. 2018. V. 41. № 6. P. 360–372.
- Janas A.M., Sapoń K., Janas T., Stowell M.H.B., Janas T. // Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes. 2016. V. 1858. № 6. P. 1139–1151.
- Zappulli V., Friis K.P., Fitzpatrick Z., Maguire C.A., Breakefield X.O. // J. Clin. Invest. 2016. V. 126. № 4. P. 1198–1207.
- Gold P.W., Machado-Vieira R., Pavlatou M.G. // Neural. Plasticity. 2015. V. 2015. P. 581976.
- Januar V., Saffery R., Ryan J. // Int. J. Epidemiol. 2015. V. 44. P. 1364–1387.
- Gururajan A., Clarke G., Dinan T.G., Cryan J.F. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2016. V. 64. P. 101–133.
- Strawbridge R., Young A.H., Cleare A.J. // Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2017. V. 13. P. 1245–1262.
- Hacimusalar Y., Eşel E. // Noro. Psikiyatr. Ars. 2018. V. 55. № 3. P. 280–290.
- Dean J., Keshavan M. // Asian. J. Psychiatry. 2017. V. 27. P. 101–111.
- Dickens A.M., Tovar-Y-Romo L.B., Yoo S.W.W., Trout A.L., Bae M., Kanmogne M., Haughey N.J. // Sci. Signal. 2017. V. 10. Issue 473. eaai7696.
- Brites D., Fernandes A. // Front. Cell. Neurosci. 2015. V. 9. P. 1–20.
- Camkurt M.A., Acar Ş., Coşkun S., Güneş M., Güneş S., Yılmaz M.F., Tamer L. // J. Psychiatr. Res. 2015. V. 69. P. 67–71.
- Zhang Y., Zhao Y., Tian C., Wang J., Li W., Zhong C. // Eur. J. Psychiatr. 2018. V. 32. 3. P. 105–112.
- Tavakolizadeh J.I., Roshanaei K., Salmaninejad A., Yari R., Nahand J.S., Sarkarizi H.K., Mousavi S.M., Salarinia R., Rahmati M., Mousavi S.F., Mokhtari R., Mirzaei H. // J. Cell. Biochem. 2018. V. 119. № 5. P. 3783–3797.
- Narahari A., Hussain M., Sreeram V. // Innov. Clin. Neurosci. 2017. V. 14. № 1–2. P. 53–55.
- Beck A.T., Ward C.H., Mendelson M., Mock J., Erbaugh J. // Arch. Gen. Psychiatr. 1961. V. 4. P. 561–571.
- Тарабрина Н.В. Практикум по психологии посттравматического стресса. СПб.: Питер, 2001. (Серия «Практикум по психологии»).
- Spielberger C.D., Gorsuch R.L., Lushene R., Vagg P.R., Jacobs G.A. // Manual for the State-Trait Anxiety In-

- ventory. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press, 1983.
26. Hanin Y., Spielberger C.D. // Series in Clinical & Community Psychology: Stress & Anxiety. 1983. V. 2. P. 15–26.
 27. Hamilton M. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1960. V. 23. P. 56–62.
 28. Witwer K.W., Buzas E.I., Bemis L.T., Bora A., Lasser C., Lotvall J., Nolte-t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Thery C., Wauben M.H., Hochberg F. // J. Extracell. Vesicles. 2013. V. 2. № 1. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
 29. Gámez-Valero A., Monguió-Tortajada I. M., Carreras-Planella I. L., la Franquesa M., Beyer K., Borràs F.E. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 33641.
 30. Krady J.K., Lin H.W., Liberto C.M., Basu A., Kremlev S.G., Levison S.W. // J. Neurosci. Res. 2008. V. 86. № 7. P. 1538–1547.
 31. Baek J.Y., Yeong Jeong J., In Kim So-Yoon Won K., Cheul Chung Y., Han Nam J., Ju Cho E., Tae-Beom Ahn T.-B., Bok E., Won-Ho Shin, Byung Kwan Jin, Int. // J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 11. P. 35–43.
 32. Lin H.W., Jain M.R., Li H., Levison S.W. // J. Neuroinflammation. 2009. V. 6. P. 6–7.
 33. Yirmiya R., Rimmerman N., Reshef R. // Trends Neurosci. 2015. V. 38. № 10. P. 637–658.
 34. Kuwano N., Kato T.A., Mitsuhashi M., Sato-Kasai M., Shimokawa N., Hayakawa K., Ohgidani M., Sagata N., Kubo H., Sakurai T., Kanba S. // Affect. Disord. 2018. V. 240. P. 88–98.
 35. Gupta A., Pulliam L. // J. Neuroinflammation. 2014. V. 11. P. 68.
 36. Réus G.Z., Fries G.R., Stertz L., Badawy M., Passos I.C., Barichello T., Kapczinski F., Quevedo J. // Neuroscience. 2015. V. 300. P. 141–154.
 37. Serafini G., Rihmer Z., Amore M. // Neuroimmunol. Neuroinflamm. 2015. V. 2. P. 127–130.
 38. Tsilioni I., Theoharides T.C. // J. Neuroinflammation. 2018. V. 15. № 1. P. 239.

Elevated Levels of Serum Exosomes in Patients with Major Depressive Disorder

A. A. Yakovlev^{a, b}, T. A. Druzhkova^a, R. V. Nikolaev^a,
V. E. Kuznetsova^a, S. K. Gruzdev^c, A. B. Guekht^a, and N. V. Gulyaeva^{a, b}

^aMoscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow, Russia

^bDepartment of Functional Biochemistry of the Nervous System,
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow, Russia

^cInstitute of Medicine, People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Received January 14, 2019;

Revised February 7, 2019;

Accepted February 12, 2019

Exosomes are vesicles of endocytic membrane of small size (30–100 nm) that may be found in the endosome system of multivesicular organs and are released after fusion of multivesicular bodies with plasma membrane. Exosomes function as carriers for specific loads and are stable in biological fluids, hence, exosomes are considered as the potential biomarkers of different diseases. The degree of involvement and functional significance of exosomes in pathogenesis of depression are poorly studied. The development of diagnostic methods for depressive disorders based on the analysis of circulating exosomes is very promising despite the methodological complications related to their isolation and identification. The purpose of this study was to isolate exosomes from the blood serum of patients with major depressive disorder (MDD) and compare with the healthy volunteers using different methods of evaluation. The concentration of serum exosomes assessed with the method of dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis, and enzyme-linked immunoassay, was statistically elevated in patients with MDD compared to healthy volunteers. The possible connection between the increased level of serum exosomes with cell-mediated immune activation that is seen in depression is discussed.

Keywords: exosomes, blood serum, major depressive disorder, nanoparticle tracking analysis, dynamic light scattering, ELISA