

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ МАЛЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ДЕПРЕССИЕЙ, ЭПИЛЕПСИЕЙ И ЭПИЛЕПСИЕЙ С ДЕПРЕССИЕЙ

© 2023 г. А. А. Яковлев^{1, 2, *}, Т. А. Дружкова², А. Стефанович³, Ю. В. Моисеева¹,
Н. А. Лазарева¹, М. С. Зинчук², Ф. К. Ридер², А. Б. Гехт^{2, 4}, Н. В. Гуляева^{1, 2}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия

²Научно-практический психоневрологический центр
им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.05.2023 г.

После доработки 01.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

Свойства малых внеклеточных везикул (мВВ) и их состав в настоящее время изучены недостаточно, особенно в контексте психических расстройств. Для выяснения роли мВВ проведен количественный анализ мВВ в крови у больных фокальной эпилепсией, больных фокальной эпилепсией с депрессией, психогенными неэпилептическими приступами (ПНЭП) с депрессией, чистой депрессией и биполярным аффективным расстройством (БАР) с текущим депрессивным эпизодом (ДЭ). Малые ВВ выделяли из сыворотки с помощью гель-фильтрации или преципитации ПЭГ, и оба метода показали очень похожие результаты. Во фракции мВВ определяли активность лизосомальных ферментов. Кроме того, были выделены и количественно охарактеризованы нейрональные мВВ. Концентрация мВВ в крови у пациентов с депрессией, фокальной эпилепсией или депрессией с фокальной эпилепсией была выше, чем у здоровых добровольцев. Не было обнаружено различий между пациентами и контрольной группой с точки зрения концентрации нейрональных мВВ. Еще одним выводом нашей работы является то, что мВВ в сыворотке больных содержат различные лизосомальные ферменты. Мы предполагаем, что концентрация мВВ в крови у больных с депрессией или эпилепсией выше за счет секреции мВВ иммунными клетками. Обнаружение мВВ в крови пациентов с депрессией и фокальной эпилепсией делает обоснованными будущие попытки использовать мВВ в качестве диагностических инструментов для этих расстройств.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, сыворотка крови, депрессивное расстройство, эпилепсия, динамическое светорассеяние

DOI: 10.31857/S1027813323040246, EDN: OSXXQV

Список использованных сокращений

мВВ — малые внеклеточные везикулы
ПНЭП — психогенные неэпилептические приступы
БАР — биполярное аффективное расстройство
ДЭ — депрессивный эпизод
ПЭГ — полиэтиленгликоль
BMI — индекс массы тела
BDI-II — шкала депрессии Бека

MMSE — краткая шкала оценки психического статуса

ВВЕДЕНИЕ

Термин малые внеклеточные везикулы (мВВ) используется для частиц размером 100–200 нм [1]. Использование этого термина в первую очередь рекомендуется для случаев, когда состав и происхождение частиц неизвестно или плохо охарактеризовано. К мВВ относятся экзосомы и эктосомы (также известные как микровезикулы) [1], причем экзосомы — фракция частиц эндосомального

* Адресат для корреспонденции: 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А, e-mail: al_yakovlev@ihna.ru.

происхождения — изучены лучше, тогда как об эктосомах данных сравнительно мало.

В настоящее время сигнализация с участием мВВ (в первую очередь экзосом) изучается очень активно [2]. Особое внимание уделяется передаче сигналов с помощью мВВ в головном мозге и изучению роли мВВ в развитии неврологических расстройств. мВВ головного мозга способны проникать через гематоэнцефалический барьер в кровь и, следовательно, могут служить доступным источником информации о состоянии головного мозга при различных патологиях [3]. Роль мВВ в течении неврологических заболеваний показана при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и боковом амиотрофическом склерозе [4–7]. Нами ранее было показано, что концентрация мВВ в крови увеличивается при наличии у больного депрессивного расстройства [8]. Увеличение концентрации мВВ было продемонстрировано четырьмя независимыми методами: анализом траекторий наночастиц, динамическим светорассеянием, содержанием белка в экзосомальной фракции и иммуноферментным анализом. Результаты, полученные этими методами, сильно коррелировали друг с другом. В той же работе было показано, что динамическое рассеяние света является наиболее простым и удобным для пользователя методом грубой оценки концентрации частиц размером около 100 нм [8].

В следующем эксперименте мы попытались уточнить тип депрессии, характеризующийся повышенным уровнем мВВ в сыворотке крови. Другая цель заключалась в выделении и количественной оценке мВВ нейронального происхождения из крови пациентов. В нашем случае наиболее подходящим методом выделения мВВ из сыворотки оказалась гель-фильтрация, так как этот метод обеспечивает наименьший уровень сывороточных белков во фракции мВВ [9]. Однако в некоторых экспериментальных ситуациях требуются другие методы выделения мВВ из крови. В частности, для выделения фракции нейрональных экзосом необходимо выделение суммарной фракции частиц из крови с использованием высокомолекулярных полиэтиленгликолей (ПЭГ) [6]. Таким образом, в ряде экспериментов необходимо использовать два метода выделения мВВ: преципитацию с помощью ПЭГ и гель-фильтрацию. В то же время остается неизвестным, насколько хорошо коррелируют результаты, полученные этими методами, поэтому мы исследовали корреляцию между этими методами на большом количестве образцов.

мВВ содержат много белков, но функциональное значение большинства секретируемых везикулярных белков неизвестно. В настоящее время получены примеры функционально секретируемых ферментов для нескольких протеаз семейства ме-

таллопротеиназ [10]. Например, в микроокружении опухоли процесс экзосомальной секреции лизосомальных катепсинов является частью опухолевой инвазии [11]. Ранее мы наблюдали секрецию функциональных лизосомальных ферментов [12, 13], но не имеем доказательств конститутивной лизосомальной секреции этих ферментов в составе мВВ. Поэтому еще одной целью нашего исследования была проверка везикулярной локализации секретируемых лизосомальных ферментов.

В настоящей работе мы впервые показали, что сывороточные мВВ содержат лизосомальные ферменты, в том числе функционально активные протеазы. Мы оценили не только функциональное содержание мВВ из сыворотки крови, но и количество мВВ в сыворотке крови больных депрессией или эпилепсией. Наши результаты показали повышенный уровень мВВ в крови у всех пациентов с депрессией, эпилепсией и депрессией с эпилепсией. При этом концентрация нейрональных мВВ не отличалась от контроля. Таким образом, мы делаем вывод, что повышенный уровень циркулирующих мВВ в крови больных с психическими и неврологическими расстройствами не связан с секрецией мВВ головным мозгом. Одно из возможных объяснений наших результатов состоит в том, что дополнительные мВВ в крови пациентов с этими патологиями секретируются иммунными клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование были включены 20 больных униполярной депрессией (F32.1, F32.2, F33.1, F33.2), 6 больных биполярным аффективным расстройством с ДЭ (F31.3, F31.4), больные фокальной эпилепсией (G40.1, G40.2, G40.9), девять из них без ДЭ и восемь больных с ДЭ (F32.1, F32.2, F33.1, F33.2), пять больных с ПНЭП (F44.5) с ДЭ (F32.1, F32.2, F33.1, F33.2) и 10 участников контрольной группы. Субъекты включались последовательно из пациентов Московского научно-практического центра психоневрологии с 14.01.2019 по 14.07.2019, если они соответствовали критериям включения. Отдельная группа пациентов, сопоставимая с ранее включенными пациентами, была включена в исследование для определения содержания липидов с 16.09.2019 по 31.12.2019. Критериями включения пациентов были: наличие текущего ДЭ по диагностическим критериям МКБ-10, возраст от 18 до 60 лет. Критериями включения в контрольную группу были: возраст от 18 до 60 лет. Критериями исключения для всех групп были: расстройства шизофренического спектра; история злоупотребления алкоголем и психоактивными веществами; тяжелые неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, черепно-мозговые травмы);

дислипидемия; эндокринные нарушения (сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы или прием тиреотропных препаратов/заместительная терапия); любые инвалидизирующие заболевания внутренних органов; серьезный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки перед обследованием, круглосуточные смены, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период до госпитализации или до участия в исследовании. Демографическая информация включала возраст, пол, уровень образования, экономический статус. Мы также собирали информацию об индексе массы тела (ИМТ). Исследование было одобрено этическим комитетом, и все участники подписали информированное согласие до начала исследования.

Диагноз фокальной эпилепсии был установлен двумя опытными эпилептологами в соответствии с классификацией Международной противосудорожной лиги (ILAE) [14]. Пациентов с ПНЭП после видео-ЭЭГ-мониторинга обследовали два опытных эпилептолога и психиатр, специализирующийся на диссоциативных расстройствах. Диагноз депрессивного эпизода был установлен психиатром с помощью M.I.N.I. международного нейropsychиатрического интервью (M.I.N.I. v 7.0.2). Для количественной оценки симптомов депрессии использовали валидированную российскую версию [15] BDI-II [16], которая является “золотым стандартом” для подобных исследований. По этой шкале 0–13 баллов соответствуют минимальной депрессии, 14–19 – легкой депрессии, 20–28 – умеренной депрессии, 29–63 – тяжелой депрессии. Скрининг на биполярное расстройство проводился с помощью валидированной русской версии [17] опросника гипомании – HCL-32 [18] с порогом ≥ 14 , а диагноз подтверждался психиатром с использованием M.I.N.I. Когнитивную функцию оценивали с помощью MMSE [19], а балл 24 и выше считали нормальным. Длительность расстройства также оценивалась для всех пациентов.

Сбор образцов. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови у пациентов и участников контрольной группы осуществлялся путем венопункции утром до еды. Известно, что на формирование мВВ влияет множество факторов [20], поэтому процедура забора крови и преаналитический этап пробоподготовки были максимально стандартизированы. Для всех проб соблюдались одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, тип моноветта и размер иглы (21.5 G); временной интервал (не более 30 мин) и комнатная температура между забором крови и центрифугированием (22°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа. Пациенты с депрессивным расстройством были про-

анализированы до назначения медикаментозной терапии.

Выделение мВВ из сыворотки с помощью гель-фильтрации. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования № 40606 ИВНД и НФ РАН “Функциональное картирование мозга”. Перед выделением мВВ образцы сыворотки крови очищали от клеточного дебриса, агрегатов и высокомолекулярных комплексов центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при 4°C. мВВ выделяли из полученной сыворотки с помощью гель-фильтрации. Колонку для гель-фильтрации заполняли 10 мл смолы Sepharose CL-2B (GE Healthcare, США) и уравнивали PBS. На колонку наносили предварительно отцентрифугированную сыворотку крови в объеме 500 мкл, после добавления пробы наносили 2.5 мл PBS, элюат отбрасывали. После этого наносили 1 мл PBS и собирали элюат для дальнейшего анализа. Перед следующей пробой колонку промывали не менее 10 мл PBS [21]. мВВ были заморожены при -80°C .

Выделение мВВ с помощью преципитации ПЭГ 6000. Фракция мВВ была выделена по протоколу, описанному ранее с некоторыми модификациями [22]. Перед выделением мВВ образцы сыворотки крови очищали от клеточного дебриса, агрегатов и высокомолекулярных комплексов центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при 4°C. Полученную сыворотку осаждали ПЭГ 6000. Для этого к 500 мкл сыворотки добавляли 500 мкл 6% ПЭГ 6000 в 45 mM NaCl и смесь инкубировали в течение 30 мин на льду. Затем образцы центрифугировали при 1500 g в течение 30 мин при 4°C. Полученный осадок промывали 100 мкл PBS и растворяли в 500 мкл PBS. Полученную фракцию замораживали при -80°C .

Динамическое рассеяние света. Динамическое светорассеяние фракции мВВ определяли на приборе Zetasizer Nano S производства Malvern Panalytical (Великобритания). В кварцевую кювету заливали 1 мл фракции мВВ, разбавленной в 10 раз в PBS, и определяли светорассеяние под углом 173 градуса на длине волны 633 нм в 10 повторях по 10 с. Прибор позволяет определить количество отраженных фотонов, выраженное в тысячах фотонов в секунду (kcps). Общее количество отраженных фотонов используется для расчета размера частиц, но может служить и независимым параметром, характеризующим образец. Наша предыдущая работа показала, что количество фотонов является надежным показателем, характеризующим концентрацию мВВ в образце [8].

Определение концентрации липидов во фракции мВВ. Концентрацию общих липидов определяли по сульфопосфатованилину [23]. Эппендорфы предварительно обрабатывали 70 мкл хлорофор-

ма и инкубировали на шейкере при встряхивании в течение 10 мин при 90°C до испарения хлороформа. В эти пробирки добавляли 50 мкл фракции мВВ в PBS. Затем к пробам добавляли 250 мкл 96% серной кислоты и инкубировали при встряхивании в течение 20 мин при 90°C. После инкубации образцы охлаждали до комнатной температуры и по 220 мкл каждого образца переносили в лунку 96-луночного планшета. В лунки планшета добавляли 110 мкл фосфо-ванилинового реагента (0.2 мг/мл ванилина в 17% фосфорной кислоте) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего определяли оптическую плотность при 540 нм с помощью планшетного флуориметра HidexSense. (PerkinElmer, Финляндия). В качестве стандарта использовали раствор масла в хлороформе с концентрацией до 2 мкг/мл.

Ультрафильтрация мВВ. Для проведения дот-блоттинга или анализа активности ферментов мы концентрировали частицы с использованием концентраторов Amicon Microcon YM-3. Сначала фракцию (0.5 мл) загружали в емкость для проб и центрифугировали при 13000 g в течение 40 мин при 4°C. Далее концентрированный образец отбирали в новую пробирку при 1000 g в течение 3 мин. Из 900 мкл исходной фракции sEV было получено около 200 мкл концентрата. Полученный концентрат хранили при –80°C.

Определение концентрации белка в мВВ. Концентрацию белка определяли флуоресцентным методом с использованием СВQCA. Реакцию проводили в лунках 96-луночного планшета. К 20 мкл образца добавляли 110 мкл 0.1 М боратного буфера pH 9.3, 5 мкл 20 мМ KCN и 10 мкл рабочего 2 мМ раствора СВQCA. Полученную смесь инкубировали в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре, после чего измеряли флуоресценцию при длинах волн возбуждения/испускания 450/550 нм на планшетном флуориметре Hidex Sense (PerkinElmer, Финляндия). В качестве стандарта использовали раствор БСА различной концентрации.

Выделение мВВ нейронального происхождения. Исходным материалом для выделения мВВ нейронального происхождения служила фракция мВВ, выделенная с помощью ПЭГ и концентрированная ультрафильтрацией [24]. Некоторые образцы были потрачены на оптимизацию эксперимента (время инкубации и концентрация антител), поэтому представлены результаты только на основе части исходных образцов. мВВ инкубировали ночь при 4°C в присутствии 4 мкг мышинных антител против белка CD171 человека (L1CAM) (клон 5G3, eBioscience, США) в 3% БСА. Затем добавляли 15 мкл стрептавидин-агарозы (Ultralink, Thermo Scientific, США) в 25 мкл 3% БСА и смесь инкубировали в течение 6 ч при 4°C. Затем смесь

центрифугировали в течение 1 мин при 500 g для осаждения смолы с захваченными на ней нейрональными мВВ. Осадок дважды промывали 500 мкл PBS, а затем ресуспендировали в 200 мкл 0.1 М раствора глицина, pH 2.5, встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали в течение 1 мин при 500 g для диссоциации нейрональных мВВ от смолы. Элюаты немедленно нейтрализовали 10 мкл 1 М Трис pH 8.0. Концентрацию мВВ в элюатах оценивали методом динамического светорассеяния.

Дот-блот. Чтобы оценить наличие тетраспанинов в нейрональных мВВ, мы провели дот-блоттинг с использованием антител против CD9 (MA1-80307, Thermo, Великобритания), CD81 (SAB3500454, Sigma, Германия) и CD63 (10628D, Thermo, Норвегия). мВВ наносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью аппарата Bio-Dot (Biorad, США). Мембрану высушивали на воздухе и блокировали 2% обезжиренным сухим молоком в TBST в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем обрабатывали антителами при комнатной температуре в течение 1 ч. После трехкратной промывки TBST по 10 мин мембрану инкубировали с субстратом в течение 5 мин. Хемилюминесценцию определяли с помощью MicroChemi (DNR Bio Imaging systems ltd, Израиль) и количественно определяли с помощью программного обеспечения GelQuant.

Протеолитическая активность с субстратом омникатепсина. Суммарную протеолитическую активность цистеинзависимых катепсинов определяли в мВВ, выделенных методом гель-фильтрации. Небольшой набор образцов был случайным образом выбран из каждой группы и объединен для проведения пилотного эксперимента. В этом пилотном эксперименте было определено оптимальное время инкубации, поэтому количество представленных образцов немного меньше, чем указано выше. Концентрированные мВВ инкубировали при 37°C в реакционном буфере (100 мМ MES pH 4.5, 10 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА) в двух параллельных образцах с добавлением 50 мкМ флуорогенного субстрата (*N*-бензоксикарбокси-Phe-Arg-7-амино-4-метилкумарин, Z-FR-AMC, субстрат омникатепсина для всех цистеиновых катепсинов). Флуоресценцию измеряли в течение 60 мин на планшетном флуориметре Wallac 3 (PerkinElmer, США) при длинах волн возбуждения и испускания 380 и 440 нм соответственно. Протеазную активность рассчитывали по флуоресценции известных концентраций стандарта AMC и выражали в пмоль/мин/мг белка.

Анализ активности β-гексозаминидазы. Активность β-гексозаминидазы определяли в мВВ, выделенных с помощью гель-фильтрации. Небольшой набор образцов был случайным образом

Таблица 1. Характеристика исследованных групп

Группа	Количество участников, (m/f)	Средний возраст, лет (min–max)	BMI, $M \pm SD$	Средняя длительность, лет (min–max)	BDI-II, $M \pm SD$	MMSE, $M \pm SD$
Здоровый контроль	10 (4/6)	28.4 (24–39)	22.3 $\pm$ 2.4			
Униполярная депрессия	20 (3/17)	33.4 (19–59)	23.2 $\pm$ 4.0	6.6 (0.5–20)	33.8 $\pm$ 10.4	28.5 $\pm$ 1.4
Фокальная эпилепсия без депрессии	9 (4/5)	33.7 (20–56)	25.5 $\pm$ 5.8	14.9 (3–36)	5.5 $\pm$ 3.3	27.4 $\pm$ 1.5
Фокальная эпилепсия с ДЭ	8 (2/6)	37.0 (22–52)	23.8 $\pm$ 2.9	11.1 (3–26)	19.9 $\pm$ 6.9	28.0 $\pm$ 1.3
ПНЭП с ДЭ	5 (1/4)	31.2 (18–50)	21.1 $\pm$ 2.2	9.6 (3–32)	34.0 $\pm$ 7.5	29.0 $\pm$ 1.2
БАР с ДЭ	7 (1/6)	27.9 (21–48)	24.2 $\pm$ 9.7	8.3 (2–17)	34.7 $\pm$ 10.5	28.7 $\pm$ 1.8

выбран из каждой группы и объединен для проведения пилотного эксперимента. Оптимальные экспериментальные условия (время инкубации, pH реакции и концентрация субстрата) были определены в этом пилотном эксперименте, поэтому количество представленных образцов немного меньше, чем указано выше. К концентрированным мВВ добавляли три объема 100 мМ цитрата натрия, pH 4.5, содержащего 1 мМ субстрата β -гексозаминидазы 4-метилумбеллиферил *N*-ацетил- β -D-глюкозаминида, и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Реакцию останавливали пятикратным избытком 0.1 М глицина, pH 10.5, и определяли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания 365 и 440 нм соответственно. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон.

Обработка мВВ протеазами. Для проверки локализации лизосомальных ферментов концентрированные мВВ обрабатывали протеиназой К, трипсином или проназой. Протеазы растворяли в 50 мМ Трис, pH 8.0, и смешивали с образцами до конечной концентрации 1 мг/мл. Образцы инкубировали при 37°C в течение 60 мин, после чего реакцию останавливали добавлением ФМСФ до 1 мМ. В полученных образцах определяли активность гексозаминидазы, как описано выше. Кроме того, протеазное расщепление лизосомальных ферментов во фракции sEV проверяли в присутствии 1% SDS.

Статистический анализ. Статистический анализ выполнен в STATISTICA for Windows ver. 12.5 (StatSoft Inc, США) и GraphPad Prism ver. 8 (GraphPad Soft, США). Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$), среднего значения (min–max) или среднего значения (нижний 95% доверительный интервал – верхний 95% доверительный интервал). Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA Крускала–Уоллиса). Множественные сравнения

были сделаны с использованием критерия Данна. Для выявления связи между переменными проводили корреляционный анализ с расчетом рангового коэффициента корреляции Спирмена (ρ) и линейный регрессионный анализ, для которого адекватность модели определяли по коэффициенту детерминации (R -квадрат). t -статистика использовалась для проверки того, значимо ли ρ отличается от нуля (встроенный алгоритм в GraphPad Prism). Выбросы определялись в GraphPad Prism с использованием встроенного алгоритма ROUT ($Q = 1\%$). Все обнаруженные выбросы были исключены из анализа. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительная характеристика участников исследования. Все участники всех исследуемых групп были сопоставимы по возрасту и полу. По шкале BDI-II было 8 пациентов с минимальной депрессией, 6 – с легкой депрессией, 11 – с умеренной депрессией и 23 – с тяжелой депрессией. По данным MMSE, все пациенты имели нормальные когнитивные функции. Характеристики групп представлены в табл. 1.

Корреляция количества мВВ, выделенных разными методами. Одной из целей нашего исследования было сравнение двух методов выделения мВВ: с помощью преципитации ПЭГ и с помощью гель-фильтрации. Общее количество образцов для этого эксперимента равно 56. Результаты представлены на рис. 1а. Наилучшая аппроксимация представляет собой прямую, слегка смещенную вверх от оси x (т.е. точка пересечения с осью y составляет около 3500), так что выделенные образцы ПЭГ всегда завышены по сравнению с образцами гель-фильтрации. Коэффициент наклона этой прямой равен 1.7, что больше единицы; это указывает на большее количество мВВ, выделенных с помощью ПЭГ, по сравне-

нию с количеством мВВ, выделенных с помощью гель-фильтрации (рис. 1а). Коэффициент детерминации для этой аппроксимации составил 0.44.

Между результатами этих методов выделения была обнаружена высокодостоверная корреляция $r = 0.52$ (95% доверительный интервал 0.28–0.69, $p < 0.001$), что может свидетельствовать о том, что оба метода выделяют сходные по составу фракции мВВ. В другом эксперименте проверяли связь между концентрацией липидов во фракции мВВ и интенсивностью динамического светорассеяния. Общее количество образцов для этого эксперимента составило 72. Результаты показаны на рис. 1б. Лучшим приближением является линейное приближение с нулевой концентрацией sEV, соответствующей нулевой концентрации липидов во фракции sEV (рис. 1б). Коэффициент детерминации для этого приближения составил 0.66.

Кроме того, между количеством частиц и концентрацией липидов в образцах обнаружена высокодостоверная корреляция, $r = 0.4$ (95% доверительный интервал 0.75–0.90, $p < 0.0001$), что свидетельствует о том, что все выделенные частицы имеют одинаковое содержание липидов и, вероятно, относятся к сходным по липидному составу видам. Эти эксперименты показывают, что методы ПЭГ и гель-фильтрации дают приемлемо аналогичную оценку количества частиц в образцах (рис. 1а), поэтому в некоторых случаях их можно использовать взаимозаменяемо.

Мы сравнили концентрацию мВВ в сыворотке крови больных с разными диагнозами (униполярная депрессия, фокальная эпилепсия, фокальная эпилепсия с ДЭ, ПНЭП с ДЭ и БАР с ДЭ), выделив мВВ двумя разными методами. Как и ожидалось, результаты оказались очень похожими (рис. 1а). Количество мВВ, выделенных с помощью ПЭГ, показано на рис. 1в, а количество мВВ, выделенных с помощью гель-фильтрации, показано на рис. 1г. И в первом, и во втором случае дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса выявил достоверные различия ($H(5, 56) = 16.45$, $p = 0.006$, $H(5, 56) = 16.67$, $p = 0.005$, соответственно).

Оба метода выделения мВВ выявляют значительное повышение концентрации частиц в сыворотке крови больных фокальной эпилепсией по сравнению с контрольной группой (рис. 1в, г). Гель-фильтрация оказалась более чувствительной в выявлении различий между группами (рис. 1г). В сыворотке крови больных депрессией или депрессией с фокальной эпилепсией концентрация частиц была значительно повышена относительно контроля (рис. 1г). Среднее значение и доверительный интервал (нижний 95% ДИ – верхний 95% ДИ) для контрольной группы на рис. 1в составляет 4594 (2801–6387), а для группы с фокаль-

ной эпилепсией – 13902 (9241–18563). На рис. 1г средние значения и доверительные интервалы составляют 1155 (539–1771) для контрольной группы, 2876 (2426–3325) для депрессии без эпилепсии, 4411 (2388–6435) для эпилепсии без депрессии и 3007 (1803–4212) для депрессии с эпилепсией. Так, доверительный интервал для контрольной группы лежит значительно ниже доверительного интервала для группы эпилепсии (рис. 1в и 1г), а также для группы депрессии (рис. 1г). Эти результаты позволяют сделать вывод, что группа депрессии и группа эпилепсии достоверно отличаются от контрольной группы, несмотря на не столь большое количество пациентов в группах.

Таким образом, все данные, представленные на рис. 1, лежат в основе нашего первого важного методологического вывода, заключающегося в том, что оба метода выделения мВВ из сыворотки дают очень близкие результаты. Второй вывод имеет научное значение: у пациентов с ДЭ и фокальной эпилепсией при ДЭ и у пациентов только с фокальной эпилепсией концентрация мВВ в сыворотке значительно повышена (рис. 1г). Это открытие требует более глубокого изучения происхождения и состава мВВ в сыворотке крови.

Мы предположили, что повышение концентрации мВВ в крови больных с психическими и неврологическими расстройствами связано с мВВ нейронального происхождения. Однако оказалось, что концентрация мВВ нейронального происхождения в крови этих больных не отличалась от контрольного уровня. Этот результат подтверждается данными динамического светорассеяния (рис. 2а), а также иммунореактивностью тетраспанинов CD81 (рис. 2б), CD9 (рис. 2в) и CD63 (рис. 2г) во фракции нейрональных мВВ.

Мы измеряли активность лизосомальных ферментов во фракции мВВ. Основываясь на наших предыдущих результатах, мы решили определить активность β -гексозаминидазы и общую протеолитическую активность лизосомальных цистеиновых катепсинов. В этом эксперименте все образцы были сконцентрированы примерно в четыре раза, поскольку активность в неконцентрированных образцах обычно не обнаруживалась (данные не представлены). Активность лизосомальной β -гексозаминидазы при мВВ в сыворотке больных показана на рис. 3а, а суммарных лизосомальных цистеиновых катепсинов – на рис. 3б. Различий между группами не обнаружено. Несмотря на то, что различий обнаружено не было, эти активности обнаруживались во всех образцах с высокой достоверностью. В случае, когда обе активности происходят из одной и той же органеллы, лизосомы, мы ожидаем найти корреляцию между активностью β -гексозаминидазы и цистеиновых катепсинов. Для проверки взаимосвязи между этими действиями был проведен ли-

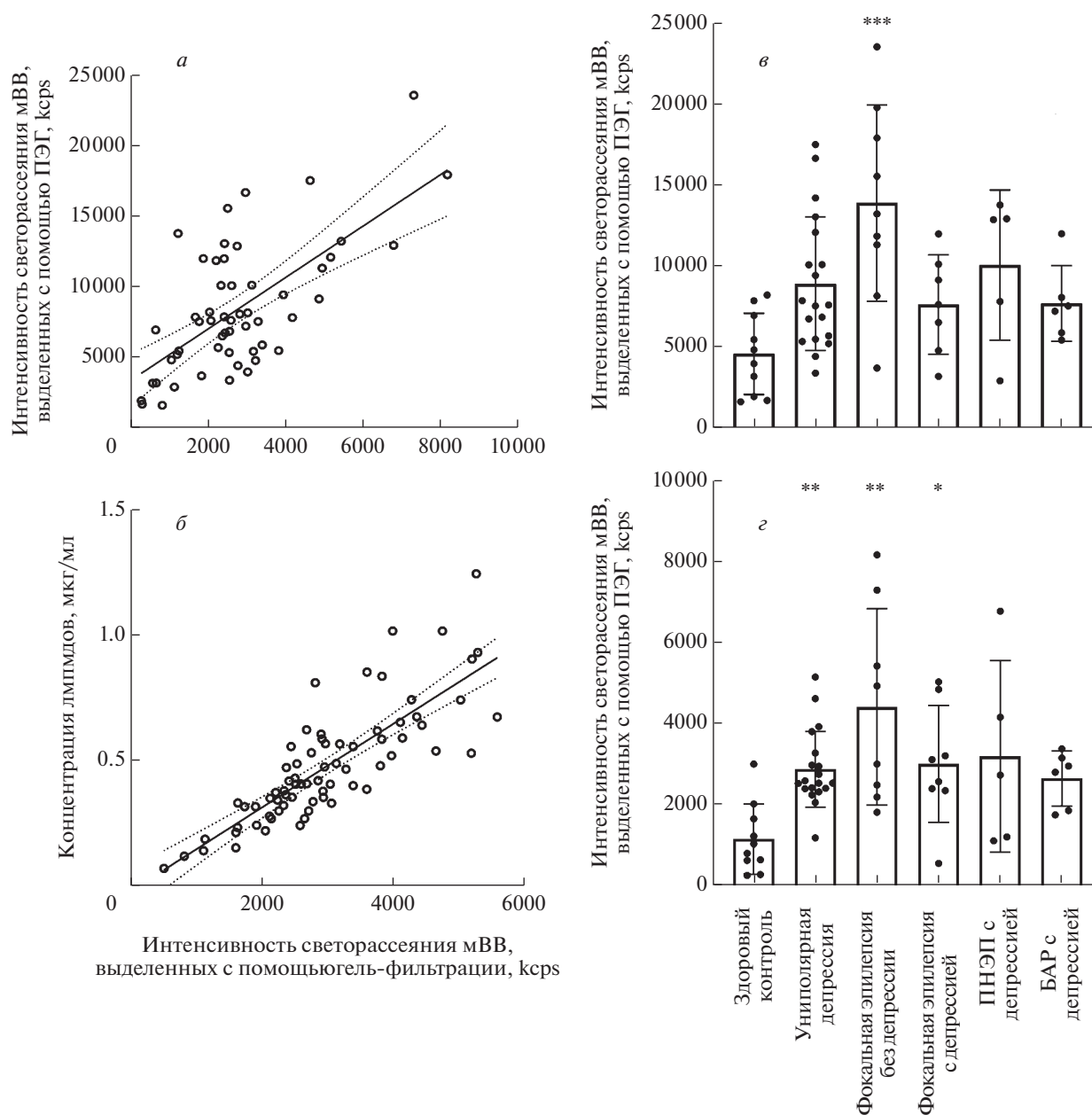


Рис. 1. Два метода выделения мВВ дали схожие результаты. Каждая точка представляет отдельного пациента. (а) Корреляция между концентрацией частиц в образцах, выделенных ПЭГ, и образцах, выделенных гель-фильтрацией. Коэффициент корреляции $r = 0.52$ (95% доверительный интервал 0.28–0.69, $p < 0.0001$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. Концентрацию частиц, выделенных двумя способами, оценивали по динамическому светорассеянию; (б) Корреляция между концентрацией частиц в образцах, выделенных гель-фильтрацией, и концентрацией липидов в этих образцах. Коэффициент корреляции $r = 0.84$ (95% доверительный интервал 0.75–0.90, $p < 0.0001$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. Концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию, а концентрацию липидов – по сульфифосфованилину; (в) Концентрация частиц в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Частицы выделяли с помощью ПЭГ, а их концентрацию оценивали по динамическому светорассеянию. Дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса ANOVA $H(5, 56) = 16.45$, $p = 0.006$, множественные сравнения с контрольной группой проводились по критерию Данна, *** $p < 0.001$ с контролем. Размер выборки $n = 10$ для здорового контроля, $n = 19$ для униполярной депрессии, $n = 9$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 7$ для фокальной эпилепсии при ДЭ, $n = 5$ для психогенных неэпилептических припадков при ДЭ, $n = 6$ для биполярного аффективного расстройства при ДЭ; (г) Концентрация частиц в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Частицы выделяли гель-фильтрацией, концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию. Дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса ANOVA $H(5, 56) = 16.67$, $p = 0.005$, множественные сравнения с контрольной группой проводились по критерию Данна, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ с контролем. Размер выборки $n = 10$ для здорового контроля, $n = 19$ для униполярной депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии при ДЭ, $n = 5$ для психогенных неэпилептических припадков при ДЭ, $n = 6$ для биполярного аффективного расстройства при ДЭ.

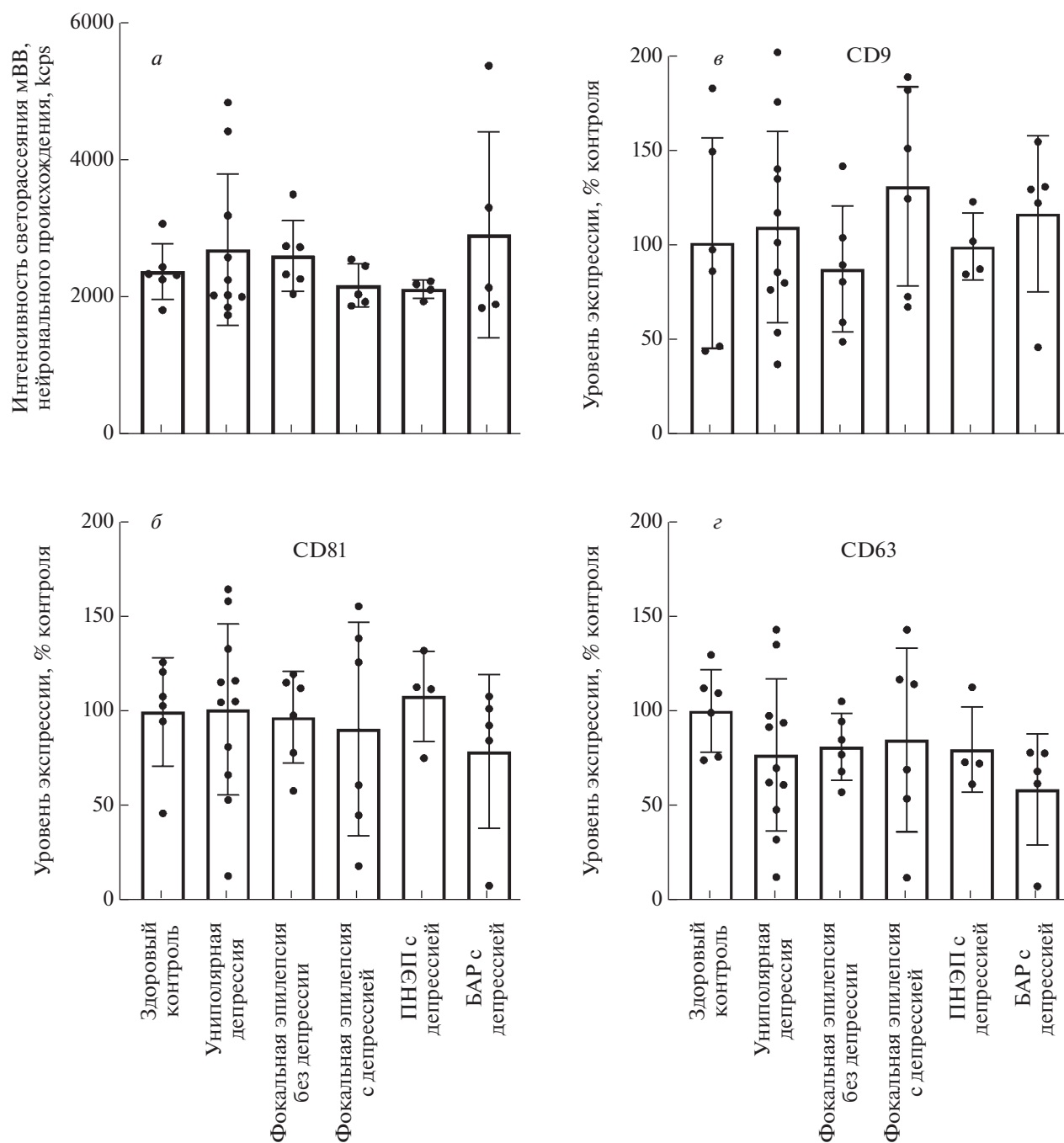


Рис. 2. мВВ нейронального происхождения в сыворотке крови больных с разными диагнозами. (а) Концентрация мВВ нейронального происхождения в сыворотке крови больных с разными диагнозами. мВВ сначала осаждали ПЭГ, а затем иммунопреципитировали антителом L1CAM (CD171). Концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию; (б) Иммунореактивность CD81 частиц, несущих L1CAM. Различий между группами выявлено не было; (в) Иммунореактивность CD9 частиц, несущих L1CAM. Различий между группами выявлено не было; (г) CD63-иммунореактивность частиц, несущих L1CAM. Различий между группами выявлено не было. Для всех представленных графиков размер выборки $n = 6$ для здорового контроля, $n = 11$ для униполярной депрессии, $n = 6$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 6$ для фокальной эпилепсии с депрессией, $n = 5$ для ПНЭП с депрессией, $n = 6$ для БАР с депрессией.

нейный регрессионный анализ; результаты представлены на рис. 3в. Коэффициент детерминации для этого приближения составил 0.66. Наилучшим приближением является линейное прибли-

жение с нулевой активностью лизосомальных цистеинзависимых протеаз в мВВ, что соответствует активности лизосомальной β -гексозаминидазы во фракции мВВ, близкой к нулю (рис. 3в). Меж-

ду этими двумя активностями была обнаружена высокодостоверная корреляция $r = 0.89$ (95% доверительный интервал 0.81–0.94, $p < 0.0001$), что указывает на то, что обе активности имеют один и тот же источник, в нашем случае — это лизосомы. Известно, что ферментативная активность, связанная с мВВ, может исходить из сыворотки, а не из содержимого мВВ. Таким образом, остался невыясненным вопрос об источнике активности лизосомальных ферментов. Для его выяснения мы обработали мВВ различными протеазами и обнаружили полностью сохраненную β -гексозаминидазную активность во фракции мВВ (рис. 3г), что указывает на истинную внутривезикулярную локализацию лизосомальных ферментов или на тесную связь лизосомальных ферментов с мВВ, так что они защищены от деградации протеазами белковой короной мВВ.

В этом же эксперименте показано, что инкубация sEVs с протеиназой К в присутствии 1% SDS полностью подавляет активность β -гексозаминидазы (данные не представлены). Активность лизосомальных цистеиновых катепсинов в мВВ после обработки протеазами не определяли, поскольку мы использовали неспецифический субстрат, который может расщепляться и добавленными протеазами, что может приводить к завышению активности катепсинов. Корреляция между активностью различных лизосомальных ферментов в мВВ указывает на то, что лизосомы являются источником некоторых мВВ. Результаты, полученные с β -гексозаминидазой после обработки протеазами, убедительно показали, что мВВ действительно содержат лизосомальные ферменты.

Наши результаты показывают, что концентрация мВВ в сыворотке пациентов с ДЭ, фокальной эпилепсией и ДЭ или только фокальной эпилепсией повышена по сравнению с контрольным уровнем (рис. 1г). Мы предположили, что некоторые симптомы патологии могут быть связаны с повышением уровня мВВ в сыворотке крови. Для выявления возможных ассоциаций мы провели корреляционный анализ между концентрацией мВВ и выраженностью симптомов депрессии (рис. 4а), снижением когнитивных функций (рис. 4б) и длительностью заболевания (рис. 4в). Ни одной корреляции не выявлено. Между концентрацией мВВ и возрастом пациентов выявлена слабая связь (рис. 4г) с коэффициентом корреляции $r = 0.32$ (95% доверительный интервал 0.06–0.54, $p < 0.05$) и коэффициентом детерминации 0.08.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время интерес к мВВ неуклонно растет. Показано, что мВВ участвует в самых разных процессах в организме: от обучения и памяти

[25] до preconditionирования к летальному повреждению [26, 27]. В онкологии циркулирующие мВВ определяют метастазирование [28], в области cerebrovasкулярных заболеваний мВВ являются перспективным инструментом для прогнозирования и профилактики заболеваний [29]. Весьма вероятно, что мВВ могут также опосредовать прогрессирование других заболеваний [29, 30]. В связи с этим большое значение имеют исследования роли мВВ при психических расстройствах [31]. Появляются статьи, связывающие мВВ с биполярным расстройством [32, 33], шизофренией [34–36] и депрессией [37–39]. В попытке выявить надежный маркер заболевания мы начали работать с мВВ крови при депрессивном расстройстве [8]. В той своей самой первой работе мы показали, что концентрация мВВ увеличивается в крови больных депрессией [8]. Теперь мы показываем, что это повышение не связано с мВВ нейронального происхождения. Мы предполагаем, что повышенная концентрация мВВ в крови может быть связана с известной активацией иммунной системы при депрессии [38, 40].

Иммунная система может регулировать различные функции организма с помощью мВВ [41]. В самых ранних исследованиях было показано, что экзосомы в крови больных депрессией содержат микроРНК, способные регулировать функцию иммунной системы [42]. В крысиной модели депрессии профиль экзосомальной микроРНК был изменен и, вероятно, может быть ответственным за воспаление [37]. Аналогичные свойства были показаны для эктосом [43]. Эти исследования не касаются содержания белка в мВВ и абсолютного количества мВВ в крови. Мы разделяем основную мысль с авторами цитируемых статей рассматривать мВВ как мессенджеры воспаления в крови. Выяснение содержания мВВ в крови больных депрессией является целью наших будущих исследований. Теперь мы знаем, что мВВ из сыворотки содержат маркеры лизосом, и мы планируем проверить другие маркеры мВВ. Мы предполагаем, что общий высокий уровень мВВ в сыворотке может быть связан с одной фракцией мВВ, или экзосомами, или эктосомами. Выяснение состава этой фракции должно положить начало новому пониманию депрессивного расстройства.

Роль мВВ при эпилепсии в настоящее время неясно. Содержание белков мВВ менялось в модели эпилепсии у мышей и у человека [44], но говорить о диагностической ценности этих находок преждевременно. Одной из возможных ролей мВВ при эпилептических припадках является регуляция воспаления [45]. Таким образом, уровень мВВ может быть повышен при эпилепсии из-за активации иммунной системы и может происходить из иммунных клеток. Если это так, то мы обнаруживаем очень общую черту мВВ при эпилеп-

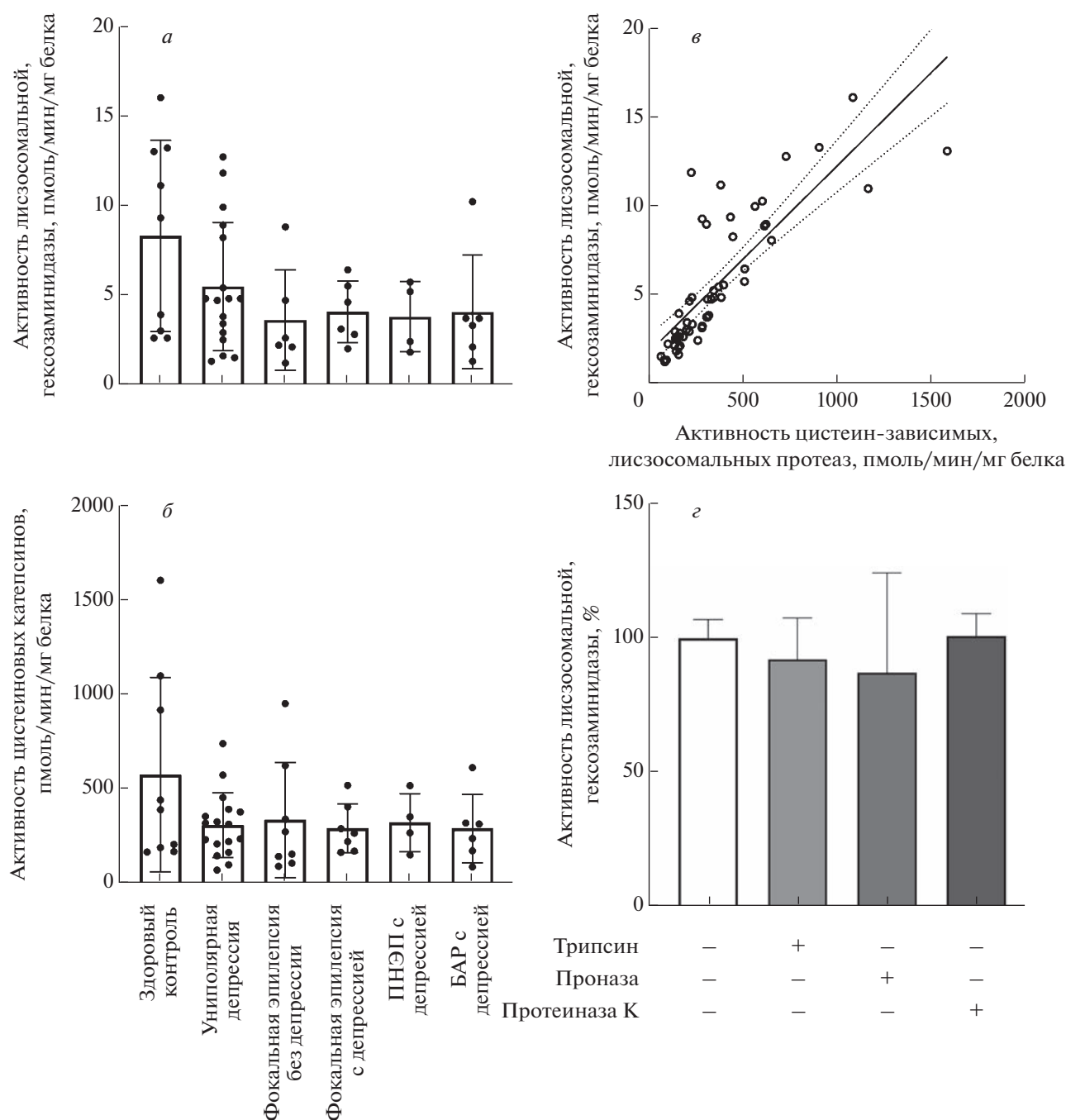


Рис. 3. мВВ в сыворотке содержат лизосомальные ферменты. (а) Активность β -гексозаминидазы в мВВ в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Различий между группами выявлено не было. Размер выборки $n = 9$ для здорового контроля, $n = 17$ для униполярной депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 7$ для фокальной эпилепсии с ДЭ, $n = 4$ для ПНЭП с ДЭ, $n = 6$ для БАР с ДЭ; (б) Суммарная активность цистеин-зависимых катепсинов в мВВ в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Различий между группами выявлено не было. Размер выборки $n = 9$ для здорового контроля, $n = 17$ для униполярной депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 7$ для фокальной эпилепсии с ДЭ, $n = 4$ для ПНЭП с ДЭ, $n = 6$ для БАР с ДЭ; (в) Корреляция между активностью β -гексозаминидазы и общей активностью цистеинзависимых катепсинов в образцах, выделенных гель-фильтрацией. Коэффициент корреляции $r = 0.89$ (95% доверительный интервал $0.81-0.94$, $p < 0.0001$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. (г) Активность β -гексозаминидазы в мВВ после обработки мВВ различными протеазами. В отдельном эксперименте обработка мВВ протеазой К в присутствии 1% SDS приводила к полному устранению активности β -гексозаминидазы мВВ (данные не представлены). Общее количество образцов составляет $N = 16$ для эксперимента с протеазами.

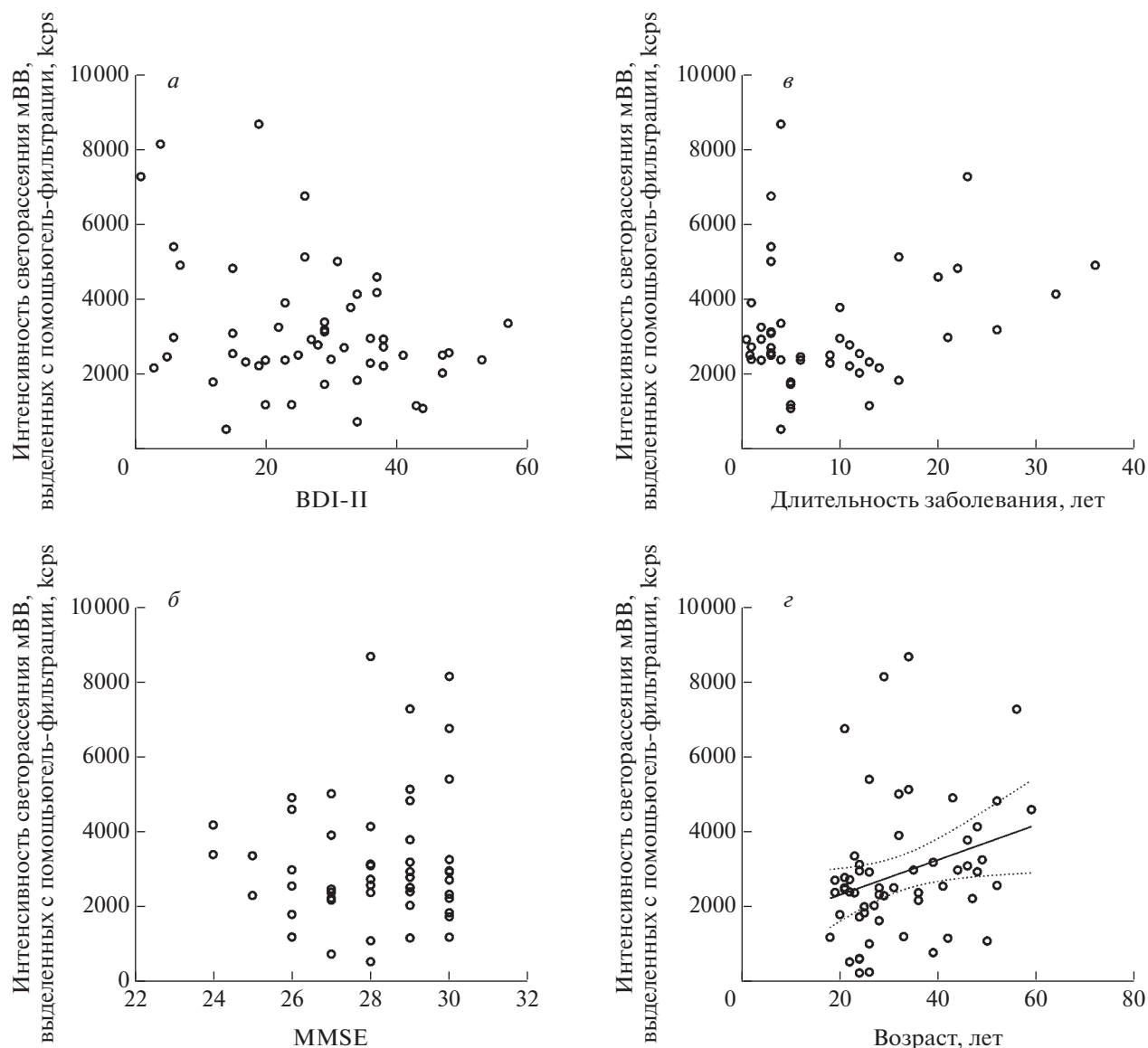


Рис. 4. Зависимость концентрации мВВ в сыворотке от выраженности депрессии, когнитивного статуса, продолжительности заболевания и от возраста. (а) Шкала депрессии Бека; (б) Когнитивные статус по MMSE; (в) Длительность заболевания; (г) Возраст. Коэффициент корреляции $r = 0.32$ (95% доверительный интервал 0.06–0.54, $p < 0.05$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. мВВ выделяли гель-фильтрацией, концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию.

сии и депрессии как мессенджеров иммунной системы.

Биогенез экзосом в настоящее время хорошо изучен [2]. Вначале образуется инвагинация плазматической мембраны, заполненная внеклеточным содержимым. Затем везикула открепляется внутри клетки с образованием первичной эндосомы. При созревании эндосомы внутри нее образуются везикулы, заполненные цитоплазматическим содержимым, и первичная эндосома становится мультивезикулярным тельцем. Далее мультивезикулярное тельце может сливаться с

аутофагосомами и/или лизосомами и подвергаться деградации, либо сливаться с плазматической мембраной, высвобождая содержимое наружу в виде экзосом. Процесс секреции может быть как ESCRT-зависимым, так и независимым [46, 47]. Биогенез экзосом также хорошо известен: везикула, наполненная цитоплазматическим содержимым, отпочковывается от плазматической мембраны [46]. Таким образом, ни при каких сценариях мВВ не должны содержать лизосомальные ферменты; тем не менее, мы обнаружили лизосомальные ферменты в мВВ.

Подобные необъяснимые находки уже встречались в литературе. В недавнем исследовании было показано, что некоторые лизосомальные белки синтезируются *de novo* в экзосомах, но авторы не обсуждают возможные механизмы этого явления [48]. Также было показано, что экзосомы нейронального происхождения из крови пациентов с болезнью Альцгеймера и контрольных добровольцев того же возраста содержат лизосомальный катепсин D [24]. Авторы исследования предполагают, что дефекты в эндолизосомной системе приводят к секреции аутолизосомного содержимого в экзосомы, хотя и не обсуждают возможные механизмы [24]. Масс-спектрометрическое исследование выявило относительное содержание лизосомальных ферментов в экзосомах мочи [49], но возможные механизмы не обсуждались. Один установленный механизм секреции лизосомальных ферментов в кровь хорошо известен. Во время активации тромбоциты [50] и тучные клетки [51] секретируют лизосомальные ферменты. Более того, процесс секреции лизосомальных ферментов коррелирует с секрецией мВВ [51]. Тем не менее, в этих ситуациях лизосомальные ферменты секретируются в невезикулярной форме, а секреция растворимых ферментов является хорошо известным следствием секреции лизосом [52, 53]. Процессы секреции лизосом, аутофагосом и экзосом имеют как минимум два общих механизма – снижение активности протеинкиназы PIKfyve [54, 55] или повышение активности транскрипционного фактора TFEB [56, 57]. Таким образом, секреция лизосомальных ферментов может происходить одновременно с секрецией экзосом, но не в виде внутрипузырного содержимого.

Лизосомальный экзоцитоз, высвобождение экзосом и секреторная аутофагия очень часто взаимосвязаны [58]. Важным случаем одновременной секреции экзосом и лизосомальных ферментов является процесс лизосомальной секреции в ситуации, когда лизосомы содержат интактные экзосомы [59, 60]. Хотя строгих доказательств получено не было, предполагается, что мультивезикулярные тельца сливаются с лизосомами, но их содержимое не расщепляется лизосомальными ферментами, а секретируется вместе с содержимым лизосом [59, 60]. Аналогичная ситуация возникает, когда клетка секретирует аутофагосомы, которые поглощают патогенные бактерии [61]. Обычно это может произойти только в том случае, если лизосомы клетки не в состоянии справиться с возбудителями внутри клетки. Но во всех этих случаях секретируемые лизосомальные ферменты не находятся внутри секретируемых мВВ, а секретируются вместе с мВВ в растворимой, не связанной с везикулами форме [59–61].

Экзосомальная секреция лизосомальных ферментов была постулирована как часть секретор-

ного фенотипа, связанного со старением [62]. Индуцированное рентгеновским излучением старение фибробластов приводит к секреции лизосомальных ферментов в экзосомах [62]. Возможным недостатком данного исследования является отсутствие обработки экзосом протеазами, что приводит к недоверию к истинной внутрипузырной локализации лизосомальных ферментов. Тем не менее, это исследование дает нам интересную возможность рассматривать активность лизосомальных ферментов во фракции мВВ сыворотки как показатель состояния старения клеток в организме [62].

В наших экспериментах лизосомальные ферменты располагаются внутри мВВ или, тесно связаны с наружной везикулярной мембраной, глубоко погружены в белковую корону мВВ, так как обработка мВВ протеазами не изменяет активность этих ферментов. Секреция лизосомальных ферментов внутри мВВ была показана впервые, поэтому еще не нашла объяснения. Можно предположить некоторые механизмы, которые могут приводить к секреции лизосомальных ферментов внутри мВВ. Широко известно, что лизосомальные ферменты могут быть обнаружены в цитозоле в результате пермеабилзации лизосомальных мембран [63]. Проницаемость лизосомальной мембраны может быть вызвана активными формами кислорода [64] и лизосомотропными агентами [65]. Катепсины могут быть обнаружены в цитозоле после пермеабилзации лизосомальной мембраны [66]. Цитозольные ферменты могут секретироваться в просвет экзосом [67]. Вероятно, мы видим эти просочившиеся ферменты в мВВ в сыворотке. В этом случае лизосомальные ферменты в мВВ отражают интенсивность разрыва лизосом в родительской клетке. Целостность лизосомальных мембран сильно нарушена при раке [66], поэтому наша гипотеза предсказывает повышенное содержание лизосомальных ферментов в мВВ из раковых клеток. Другой путь проникновения лизосомального фермента в просвет мВВ лежит через секрецию лизосом. Лизосомы выделяют свое содержимое во многих физиологических и патологических ситуациях [68]. Секретируемые ферменты могут интернализироваться клетками и секвестрироваться в ранних эндосомах, а затем повторно секретироваться в процессе эндоцитарной рециркуляции [69]. В этом случае лизосомальные ферменты в мВВ отражают секреторную активность клеток крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наша работа представляет несколько интересных результатов и предлагает новые направления исследований мВВ. Во-первых, мВВ повышены в сыворотке крови больных эпилепсией, депрессией и эпилепсией с депрессией. Во-вторых, эти

мВВ не нейронального происхождения. Источник дополнительных мВВ неизвестен, но мы связываем его с активацией иммунной системы. В-третьих, мВВ содержат лизосомальные ферменты из неизвестных клеток. Эти выводы требуют глубокого изучения, но ожидаемые результаты могут открыть новые возможности для клиники.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Автономной некоммерческой организацией “Московский центр инновационных технологий в здравоохранении”, грант № 2412-45/22.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны следующим лицам, которые помогали им в выполнении технической работы: Софья Попова, Антон Рагузин, Евгений Пашнин и Надежда Воинова. Авторы также выражают признательность компании КДСО и лично Сергею Васину и Евгению Дуплякину за помощь в разработке протокола динамического светорассеяния для обнаружения мВВ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие известных конфликтов интересов, связанных с этой публикацией, и отсутствие такой финансовой поддержки этой работы, которая могла бы повлиять на ее результаты.

Этическое одобрение. Исследование было одобрено этическим комитетом.

Информированное согласие. Все участники подписали информированное согласие до начала исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thery C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1535750.
2. Kalluri R., LeBleu V.S. // *Science*. 2020. V. 367. № 6478. eaau6977.
3. Druzhkova T.A., Yakovlev A.A. // *Neurochem. J.* 2018. V. 12. № 3. P. 195–204.
4. Ardashirova N.S., Fedotova E.Y., Illarioshkin S.N. // *Neurochem. J.* 2020. V. 14. № 2. P. 127–132.
5. Ivanova M.V., Chekanova E.O., Belugin B.V., Tutykhina I.L., Dolzhikova I.V., Zakroishchikova I.V., Vasil'ev A.V., Zakharova M.N. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 3. P. 229–239.
6. Kapogiannis D., Mustapic M., Shardell M.D., Berkowitz S.T., Diehl T.C., Spangler R.D., Tran J., Lazaropoulos M.P., Chawla S., Gulyani S., Eitan E., An Y., Huang C.W., Oh E.S., Lyketsos C.G., Resnick S.M., Goetzl E.J., Ferrucci L. // *JAMA Neurol.* 2019. V. 76. № 11. P. 1340–1351.
7. Chung C.-C., Chan L., Chen J.-H., Bamodu O.A., Chiu H.-W., Hong C.-T. // *FASEB J.* 2021. V. 35. № 10. e21895.
8. Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., Kuznetsova V.E., Gruzdev S.K., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 4. P. 385–390.
9. Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Marte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein O.K., Pfaffl M.W., Schelling G., Reithmair M. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1481321.
10. Quesnel A., Broughton A., Karagiannis G.S., Filippou P.S. // *Cancer Metastasis Rev.* 2022. V. 41. № 4. 789–801.
11. Raimondi L., De Luca A., Amodio N., Manno M., Racosta S., Taverna S., Bellavia D., Naselli F., Fontana S., Schillaci O., Giardino R., Fini M., Tassone P., Santoro A., De Leo G., Giavaresi G., Alessandro R. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 15. P. 13772–13789.
12. Onufriev M.V., Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Stepanichev M.Y., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. // *Biochem.* 2009. V. 74. № 3. P. 281–287.
13. Yakovlev A.A., Kvichansky A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2013. V. 7. № 2. P. 111–120.
14. Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M.B., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern G.W., Moshe S.L., Nordli D.R., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y.H., Zuberi S.M. // *Epilepsia*. 2017. V. 58. № 4. P. 512–521.
15. Zlobina M.V., Pervushina O.N. // *Reflexio*. 2018. V. 11. P. 83–98.
16. Beck A.T., Steer R.A., Ball R., Ranieri W.F. // *J. Pers. Assess.* 1996. V. 67. № 3. P. 588–597.
17. Mosolov S.N., Ushkalova A.V., Kostukova E.G., Shafarenko A.A., Alfimov P.V., Kostyukova A.B., Angst J. // *J. Affect. Disord.* 2014. V. 155. P. 90–95.
18. Angst J., Adolfsson R., Benazzi F., Gamma A., Hantouche E., Meyer T.D., Skeppar P., Vieta E., Scott J. // *J. Affect. Disord.* 2005. V. 88. № 2. P. 217–233.
19. Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R. // *J. Psychiatr. Res.* 1975. V. 12. № 3. P. 189–198.
20. Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-’t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H., Hochberg F. // *J. Extracell. Vesicles*. 2013. V. 2. № 1. P. 20360.
21. Gamez-Valero A., Monguio-Tortajada M., Carreras-Planella L., Marcel-la F., Beyer K., Borrás F.E. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33641.
22. Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 23978.
23. Osteikoetxea X., Balogh A., Szabo-Taylor K., Nemeth A., Szabo T.G., Paloczi K., Sodar B., Kittel A., Gyorgy B., Pallinger E., Matko J., Buzas E.I. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. e0121184.
24. Goetzl E.J., Boxer A., Schwartz J.B., Abner E.L., Petersen R.C., Miller B.L., Kapogiannis D. // *Neurology*. 2015. V. 85. № 1. P. 40–47.
25. Schiera G., Di Liegro C.M., Di Liegro I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. 266.
26. Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Aleksandrova O.P., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2020. V. 14. № 1. P. 1–5.

27. Giricz Z., Varga Z.V., Baranyai T., Sipos P., Paloczki K., Kittel A., Buzas E.I., Ferdinandy P. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. V. 68. P. 75–78.
28. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Sopplop N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Jørgen Labori K., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., De Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. // *Nature*. 2015. V. 527. № 7578. P. 329–335.
29. Gomez-Molina C., Sandoval M., Henzi R., Ramirez J.P., Varas-Godoy M., Luarte A., Lafourcade C.A., Lopez-Verrilli A., Smalla K.H., Kaehne T., Wyneken U. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2019. V. 22. № 3. P. 232–246.
30. Gulyaeva N.V. // *Biochemistry-Moscow*. 2019. V. 84. № 11. P. 1306–1328.
31. Saeedi S., Israel S., Nagy C., Turecki G. // *Transl. Psychiatry*. 2019. V. 9. № 1. P. 122.
32. Ceylan D., Tufekci K.U., Keskinoglu P., Genc S., Özerdem A. // *J. Affect. Disord.* 2020. V. 262. P. 99–107.
33. Fries G.R., Lima C.N.C., Valvassori S.S., Zunta-Soares G., Soares J.C., Quevedo J. // *J. Affect. Disord.* 2019. V. 255. P. 10–14.
34. Kapogiannis D., Dobrowolny H., Tran J., Mustapic M., Frodl T., Meyer-Lotz G., Schiltz K., Schanze D., Riet-schel M., Bernstein H.G., Steiner J. // *Eur. Psychiatry*. 2019. V. 62. P. 124–129.
35. Amoah S.K., Rodriguez B.A., Logothetis C.N., Chander P., Sellgren C.M., Weick J.P., Sheridan S.D., Jantzie L.L., Webster M.J., Mellios N. // *Neuropsychopharmacology*. 2020. V. 45. № 4. P. 656–665.
36. Goetzl E.J., Srihari V.H., Guloksuz S., Ferrara M., Tek C., Heninger G.R. // *FASEB J.* 2021. V. 35. № 2. e21339.
37. Ke F., Xu J.X., Chen X.X., Gao X.R., Huang L.L., Du A.Q., Jiang C., Ge J.F. // *J. Affect. Disord.* 2020. V. 274. P. 144–158.
38. Kuwano N., Kato T.A., Mitsuhashi M., Sato-Kasai M., Shimokawa N., Hayakawa K., Ohgidani M., Sagata N., Kubo H., Sakurai T., Kanba S. // *J. Affect. Disord.* 2018. V. 240. P. 88–98.
39. Nasca C., Dobbin J., Bigio B., Watson K., de Angelis P., Kautz M., Cochran A., Mathe A.A., Kocsis J.H., Lee F.S., Murrough J.W., McEwen B.S., Rasgon N. // *Mol. Psychiatry*. 2021. V. 26. № 9. P. 5140–5149.
40. Fruhbeis C., Frohlich D., Kuo W.P., Kramer-Albers E.M. // *Front. Cell. Neurosci.* 2013. V. 7. P. 182.
41. Brites D., Fernandes A. // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 476.
42. Zhang Y., Zhao Y., Tian C., Wang J., Li W., Zhong C. // *Eur. J. Psychiatry*. 2018. V. 32. № 3. P. 105–112.
43. Hulsmans M., Holvoet P. // *Cardiovasc. Res.* 2013. V. 100. № 1. P. 7–18.
44. Lin Z.J., Gu Y.X., Zhou R.J., Wang M.L., Guo Y., Chen Y.Y., Ma J.H., Xiao F., Wang X.F., Tian X. // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 737.
45. Gao X.Y., Mian G., Liu J., Zhu Y.M., Cui Y., Shu S.J., Gou H.Y., Sun F.X., Qi S.H., Sun J.H. // *J. Cell. Mol. Med.* 2020. V. 24. № 22. P. 12980–12993.
46. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 4. P. 213–228.
47. Skryabin G.O., Komelkov A.V., Savelyeva E.E., Tchekvina E.M. // *Biochem.* 2020. V. 85. № 2. P. 177–191.
48. Tan C.F., Teo H.S., Park J.E., Dutta B., Tse S.W., Leow M.K.S., Wahli W., Sze S.K. // *Cells*. 2020. V. 9. № 5. P. 1320.
49. Bijnisdorp I.V., Maxouri O., Kardar A., Schelfhorst T., Piersma S.R., Pham T.V., Vis A., van Moorselaar R.J., Jimenez C.R. // *J. Extracell. Vesicles*. 2017. V. 6. P. 1313091.
50. Ciferri S., Emiliani C., Guglielmini G., Orlacchio A., Nenci G.G., Gresele P. // *Thromb. Haemost.* 2000. V. 83. № 1. P. 157–164.
51. Kormelink T.G., Arkesteijn G.J.A., van de Lest C.H.A., Geerts W.J.C., Goerdal S.S., Altelaar M.A.F., Redegeld F.A., Nolte-'t Hoen E.N.M., Wauben M.H.M. // *J. Immunol.* 2016. V. 197. № 8. P. 3382–3392.
52. Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. // *Biochem.* 2015. V. 80. № 2. P. 163–171.
53. Jaiswal J.K., Andrews N.W., Simon S.M. // *J. Cell Biol.* 2002. V. 159. № 4. P. 625–635.
54. Min S.H., Suzuki A., Stalker T.J., Zhao L., Wang Y.H., McKennan C., Riese M.J., Guzman J.F., Zhang S.H., Lian L.R., Joshi R., Meng R.H., Seeholzer S.H., Choi J.K., Koretzky G., Marks M.S., Abrams C.S. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4691.
55. Hessvik N.P., Verbye A., Brech A., Torgersen M.L., Jakobsen I.S., Sandvig K., Llorente A. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 24. P. 4717–4737.
56. Yang Y., Qin M.L., Bao P.H., Xu W.C., Xu J. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 7. e0180892.
57. Medina D.L., Fraldi A., Bouche V., Annunziata F., Mansueto G., Spanpanato C., Puri C., Pignata A., Martina J.A., Sardiello M., Palmieri M., Polishchuk R., Puertollano R., Ballabio A. // *Dev. Cell*. 2011. V. 21. № 3. P. 421–430.
58. Buratta S., Tancini B., Sagini K., Delo F., Chiaradia E., Urbanelli L., Emiliani C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. P. 2576.
59. Machado E., White-Gilbertson S., van de Vlekkert D., Janke L., Moshia S., Campos Y., Finkelstein D., Gomero E., Mosca R., Qiu X.H., Morton C.L., Annunziata I., d'Azzo A. // *Sci. Adv.* 2015. V. 1. № 11. e1500603.
60. Kim M.S., Muallem S., Kim S.H., Kwon K.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 510. № 3. P. 409–415.
61. Miao Y.X., Li G.J., Zhang X.L., Xu H.X., Abraham S.N. // *Cell*. 2015. V. 161. № 6. P. 1306–1319.
62. Basisty N., Kale A., Jeon O.H., Kuehnemann C., Payne T., Rao C., Holtz A., Shah S., Sharma V., Ferrucci L., Campisi J., Schilling B. // *Plos Biol.* 2020. V. 18. № 1. e3000599.

63. Yadati T., Houben T., Bitorina A., Shiri-Sverdlov R. // *Cells*. 2020. V. 9. № 7. P. 1679.
64. Hoppe G., O'Neil J., Hoff H.F., Sears J. // *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Basis Dis.* 2004. V. 1689. № 1. P. 33–41.
65. Deng D., Jiang N., Hao S.J., Sun H., Zhang G.J. // *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*. 2009. V. 1788. № 2. P. 470–476.
66. Boya P., Kroemer G. // *Oncogene*. 2008. V. 27. № 50. P. 6434–6451.
67. Raposo G., Stoorvogel W. // *J. Cell Biol.* 2013. V. 200. № 4. P. 373–383.
68. Settembre C., Fraldi A., Medina D.L., Ballabio A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 5. P. 283–296.
69. Maxfield F.R., McGraw T.E. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. № 2. P. 121–132.

Elevated Level of Small Extracellular Vesicles in the Serum of Patients with Depression, Epilepsy and Epilepsy with Depression

A. A. Yakovlev^{a, b}, T. A. Druzhkova^b, A. Stefanovich^c, Yu. V. Moiseeva^a, N. A. Lazareva^a, M. S. Zinchuk^b, F. K. Rider^b, A. B. Guekht^{b, d}, and N. V. Gulyaeva^{a, b}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia*

^c*First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, Russia*

^d*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

Small extracellular vesicles (sEVs) properties and sEVs composition are far from being well-studied for now, especially in the context of mental disorders. To elucidate the role of sEVs in disease we performed a quantitative analysis of the blood sEV in patients with focal epilepsy and patients with focal epilepsy with depression, psychogenic non-epileptic seizures with depression, pure depression, and bipolar affective disorder with the current depressive episode (cDE). Small EVs were isolated from the serum by gel filtration or PEG precipitation, and both methods showed very similar results. Subsequently, we precipitated neuronal sEVs and quantified it with several methods. Activity of lysosomal enzymes was determined in the sEVs fraction. The concentration of the blood sEVs in patients with depression, focal epilepsy, or depression with focal epilepsy was higher than in healthy controls. No difference was found between patients and controls in terms of neuronal sEVs concentration. Another finding of our work is that sEVs in the serum of patients contains various lysosomal enzymes. We suppose that the concentration of the blood sEVs in patients with depression or epilepsy is higher due to the sEVs secretion by the immune cells. Finding sEVs in the blood of patients with depression and focal epilepsy grants validity for future attempts to use sEVs as diagnostic tools for these disorders.

Keywords: *extracellular vesicles, blood serum, depressive disorder, epilepsy, dynamic light scattering*