



© O.A. Васильева¹, Е.Я. Каданцева¹, А.Ю. Гаранин¹, Л.М. Забегина¹,
Д.А. Суров², А.В. Малек¹

Таргетная система доставки доксорубицина в клетки рака яичников на основе внеклеточных везикул плазмы и ДНК-аптамеров

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

© Olesya A. Vasilyeva¹, Ekaterina Ya. Kadantseva¹, Alexandre Yu. Garanin¹, Lidia M. Zabegina¹,
Dmitry A. Surov², Anastasia V. Malek¹

Extracellular Vesicle and DNA Aptamer-Based Targeted Delivery System for Doxorubicin to Ovarian Cancer Cells

¹N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

²S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, the Russian Federation

Введение. Эффективность системной цитостатической терапии онкологических заболеваний, включая рак яичников, ограничена токсическим повреждением здоровых тканей. Разработка технологий адресной доставки противоопухолевых препаратов является актуальной задачей. Одной из перспективных стратегий решения этой задачи стала разработка инновационных систем доставки на основе внеклеточных нановезикул (ВНВ), модифицированных ДНК-аптамерами.

Цель. Разработка технологии модификации везикулярной мембранны ДНК-аптамером и оценка эффективности разработанной системы адресной доставки доксорубицина в клетки рака яичников *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы ткани перitoneальных метастазов рака яичников ($n = 3$) и клеточные линии Skov-3 и Ovcar-3. ВНВ были выделены из плазмы здоровых доноров и исследованы с помощью анализа траекторий наночастиц (ATH) и проточной цитометрии. «Загрузка» доксорубицина (ДОКС) во ВНВ проводилась по разработанной ранее технологии сонопорации, очистка полученных комплексов ДОКС-ВНВ была проведена с помощью гель-фильтрации. Модификация везикулярной поверхности комплексов ДОКС-ВНВ осуществлялась за счет гидрофобного взаимодействия мембранны с холестеролом, ковалентно связанным с молекулой ДНК-аптамера. Оценка цитотоксичности разработанной системы доставки доксорубицина проведена с помощью МТТ-теста.

Результаты. На первом этапе исследования, по литературным данным, были выбраны кандидатные аптамеры, проведена оценка их связывания с клетками рака яичника и выбран наиболее аффинный аптамер. На втором этапе исследования была разработана везикулярная система доставки доксорубицина, включающая: получение ВНВ из плазмы доноров методом ультрацентрифугирования, «загрузку» доксорубицина во ВНВ с помощью сонопорации, очистку полученных комплексов (ДОКС-ВНВ) от свободного доксорубицина с помощью гель-фильтрации и получение

Introduction. The efficacy of systemic cytostatic therapy for oncological diseases, including ovarian cancer, is limited by toxic effects on healthy tissues. The development of targeted drug delivery technologies for anticancer agents represents an urgent priority. A promising strategy involves creating innovative delivery systems based on extracellular nanovesicles (ENVs) modified with DNA aptamers.

Aim. To develop a vesicular membrane modification technology using DNA aptamers and evaluate the efficacy of this system for targeted doxorubicin delivery to ovarian cancer cells *in vitro*.

Materials and Methods. The study utilized ovarian cancer peritoneal metastasis tissue samples ($n = 3$) and Skov-3 and Ovcar-3 cell lines. ENVs were isolated from healthy donor plasma and characterized using nanoparticle tracking analysis (NTA) and flow cytometry. Doxorubicin (DOX) loading was achieved through an optimized sonoporation protocol, followed by purification of DOX-ENV complexes using size-exclusion chromatography. Vesicular surface modification was accomplished via hydrophobic interaction between the membrane and cholesterol-conjugated DNA aptamers. System cytotoxicity was assessed using MTT assay.

Results. Initial candidate aptamer selection was performed through literature analysis and binding affinity assessment to ovarian cancer cells. The vesicular delivery system development in the second stage of the study involved: ENV isolation from donor plasma via ultracentrifugation; doxorubicin loading through sonoporation; purification of DOX-ENV complexes; and surface modification to create DOX-ENV-APT complexes. The optimized system demonstrated significantly enhanced cytotoxicity compared to non-targeted complexes (survival rates: Skov-3: 1 % vs 57 %; Ovcar-3: 0.03 % vs 0.3 %).

комплексов ДОКС-БНВ-АПТ путем модификации поверхности БНВ аптамером. В ходе заключительного этапа исследования проведен анализ цитотоксичности разработанной системы доставки ДОКС-БНВ-АПТ, которая оказалась существенно выше цитотоксичности системы ДОКС-БНВ (1 % vs 57 % выживших клеток линии Scov-3, 0,03 % vs 0,3 % выживших клеток линии Ovcar-3).

Выводы. Наличие специфичного аптамера, конъюгированного с везикулярной поверхностью, повышало эффективность везикулярной системы доставки цитостатического препарата к клеткам рака яичников в условиях *in vitro* эксперимента. Разработка системы доставки противоопухолевых препаратов на основе БНВ, модифицированных ДНК-аптамерами, представляется перспективной стратегией повышения эффективности системной химиотерапии.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; аптамеры; рак яичника; система доставки; доксорубицин

Для цитирования: Васильева О.А., Каданцева Е.Я., Гаранин А.Ю., Забегина Л.М., Суров Д.А., Малек А.В. Таргетная система доставки доксорубицина в клетки рака яичников на основе внеклеточных везикул плазмы и ДНК-аптамеров. *Вопросы онкологии*. 2025; 71(6) 1370-1380. DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-6-OF-2525

✉ Контакты: Анастасия Валерьевна Малек, anastasia@malek.com.ru,
Олеся Александровна Васильева, belolesya@yandex.ru

Введение

Рак яичников (РЯ) является серьезной социальной проблемой. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР), ежегодно в мире регистрируется более 225 тыс. случаев карциномы яичников, и около 140 тыс. женщин погибают от данного заболевания. В России число умерших от РЯ в 2023 г. составило 6 996 человек [1]. Показатель пятилетней выживаемости пациенток с РЯ составляет лишь 36–40 %, уступая аналогичным показателям других опухолей женской репродуктивной системы (рак шейки матки — C53: 44–45 %, рак тела матки — C54: 56–68 %, рак молочной железы — C50: 60–64 %) [2]. Высокая смертность при РЯ является следствием двух причин: несвоевременной диагностики и низкой эффективности терапии поздних стадий [3]. Современная тактика лечения распространенного РЯ предполагает комбинацию хирургической циторедукции (полнейшей или оптимальной) и химиотерапии (адьювантной или лечебной) [4]. В качестве поддерживающей терапии возможно использование таргетных противоопухолевых средств [5]. Активно развивается технология гипертермической интраперитонеальной химиотерапии в качестве метода профилактики или контроля рецидивов болезни [6]. Но все перечисленные подходы пока не позволяют заметно изменить фатальный характер заболевания, что указывает на актуальность задачи создания новых лечебных технологий.

Внеклеточные нановезикулы (БНВ) — продукт секреторной активности клеток всех типов. Межклеточный транспорт сигнальных молекул

Conclusion. Aptamer-mediated surface modification significantly enhanced the targeted delivery efficiency of cytostatic drugs to ovarian cancer cells *in vitro*. DNA aptamer-functionalized extracellular vesicles represent a promising platform for improving the therapeutic index of systemic chemotherapy.

Keywords: extracellular vesicles; aptamers; ovarian cancer; drug delivery system; doxorubicin

For Citation: Olesya A. Vasilyeva, Ekaterina Ya. Kadantseva, Alexandr Yu. Garanin, Lidia M. Zabegina, Dmitry A. Surov, Anastasia V. Malek. Extracellular vesicle and DNA aptamer-based targeted delivery system for doxorubicin to ovarian cancer Cells. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2025; 71(6): 1370-1380.-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-6-OF-2525

и метаболитов считается основной функцией БНВ, что указывает на возможность использования везикул в качестве естественной (даже аутологичной) системы доставки лекарственных средств [7, 8]. Многочисленные исследования продемонстрировали, что БНВ могут служить системой доставки, например, доксорубицина (ДОКС) в клетки различных опухолей, включая колоректальный рак, рак молочной железы, клетки ретинобластомы и опухоль-ассоциированные фибробласты. Перспективность везикулярных форм доставки цитостатических препаратов определяется рядом факторов. Во-первых, БНВ относительно стабильны, и «упаковка» в БНВ может стабилизировать различные соединения. Во-вторых, БНВ могут быть получены разными способами, обеспечивающими возможность контролируемого, стерильного и масштабируемого производства. В-третьих, мембрана БНВ может быть модифицирована специфическими лигандами с целью таргетного взаимодействия с опухолевыми клетками. В научной литературе представлены примеры модификации везикулярной поверхности различными лигандами, включая органические кислоты (фолиевая [9], бензойная [10], гиалуроновая [11]), углеводы (манноза [12]), пептиды [13] и ДНК-аптамеры.

Концепция аптамеров сформировалась в 90-х гг. прошлого века в результате исследований нехарактерных биохимических свойств рибонуклеиновых кислот, которые возникали в результате их взаимодействия с белками и реализовывались в ключевых процессах клеточной регуляции, включая репликацию, рекомбинацию и экспрессию генов [14]. Известно, что после-

довательность нуклеотидов в составе РНК- или ДНК-аптамера определяет пространственную структуру молекулы, которая формируется за счет комплементарного взаимодействия ее участков. Уникальная, стабильная и воспроизводимая пространственная организация молекулы лежит в основе феномена специфичного и аффинного взаимодействия аптамеров с молекулярными мишениями практически любой природы. Параллельно с изучением природных РНК-аптамеров была разработана технология направленной селекции ДНК-аптамеров с заданными характеристиками [15]. К настоящему времени в технологии селекции и методах клинического применения аптамеров достигнут существенный прогресс: несколько терапевтических молекул уже используются и десятки находятся на разных стадиях клинических испытаний [16]. По сравнению с пептидами или антителами, аптамеры обладают рядом преимуществ: возможность разработки в условиях *in vitro*, экономичность производства, малый размер, стабильность, относительная простота химической модификации, низкая иммуногенность. В контексте активного развития персонализированных технологий лечения злокачественных опухолей, аптамеры, которые часто называют «химическими антителами» (chemical antibodies), открывают новые горизонты возможностей тергетной доставки традиционных цитостатических препаратов, терапевтических РНК (siRNA, miRNA), радиофармпрепаратов или внеклеточных нановезикул в качестве системы доставки любых перечисленных противоопухолевых субстанций или их комбинаций [7].

Ранее мы показали возможность и эффективность доставки доксорубицина (ДОКС), «упакованного» в ВНВ плазмы, в клетки рака молочной железы *in vitro* [17]. В рамках пилотной работы были оптимизированы протоколы выделения ВНВ, «загрузки» доксорубицина с помощью сонопорации, очистки ВНВ от свободного доксорубицина и применения комплекса (ДОКС-ВНВ) *in vitro*. Целью данного исследования была разработка технологии модификации везикулярной мембранны ДНК-аптамером (АПТ) и оценка эффективности системы адресной доставки комплекса (ДОКС-ВНВ-АПТ) в клетки рака яичников *in vitro*.

Материалы и методы

В исследовании были использованы образцы ткани перитонеальных метастазов серозного РЯ, полученные от трех пациенток, культуры клеток РЯ и образцы плазмы здоровых доноров.

Проточная цитометрия была использована для анализа сродства ДНК-аптамеров к поверхности клеток РЯ в соответствии с ранее описан-

ным протоколом [18] и для полуколичественного анализа поверхностных «экзосомальных» маркеров. Выделение ВНВ из плазмы проводили с помощью ультра-центрифугирования. Размер и концентрацию выделенных ВНВ оценивали методом анализа траекторий наночастиц (АТН). Формирование комплексов ДОКС-ВНВ проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [17]. Отделение комплексов ДОКС-ВНВ от несвязанного с везикулами препарата проводили методом гель-фильтрационной хроматографии [19]. Формирование комплексов ДОКС-ВНВ-АПТ было основано на феномене неспецифического взаимодействия гидрофобных молекул липидов с двуслойной биологической мембраной. Цитотоксичность доксорубицина (свободной формы и в составе везикулярных комплексов) оценивали путем анализа метаболической активности клеток с помощью МТТ-теста.

Подробное описание материалов, методов, авторские названия и последовательности ДНК-аптамеров представлены в онлайн-приложении <https://voprosy-onkologii.ru/index.php/journal/article/view/6-25-Extracellular-Vesicle>.

Результаты

Выбор аптамеров

На первом этапе исследования был проведен поиск и анализ результатов исследований, авторы которых применяли технологию SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) для разработки ДНК-аптамеров, аффинно взаимодействующих с клетками РЯ. Последовательности выбранных аптамеров, авторские названия и ссылки на соответствующие публикации представлены в дополнительных материалах.

С целью оценки возможности обеспечения таргетности везикулярной системы доставки доксорубицина, все аптамеры были получены твердофазным химическим синтезом, модифицированы флуоресцином (FAM) по 3'-концу, подвергнуты нагреванию-охлаждению для формирования вторичной структуры и инкубированы с клетками. Сравнительный анализ их аффинности к клеткам РЯ был проведен с помощью проточной цитометрии. Результаты, полученные в ходе анализа культур клеток (Skov-3 и Ovcar-3), графически представлены на рис. 1 (А и Б), цветовая легенда и результаты всех экспериментов в табличном формате представлены на рис. 1, В.

В каждом эксперименте был проведен анализ клеток без инкубации с аптамером — серый (левый) пик на рис. 1, А и Б. Для оценки эффекта неспецифической адсорбции аптамеров на поверхности клеток были использованы два апта-мера к рецептору CD30 (CONTR-1 и CONTR-2),

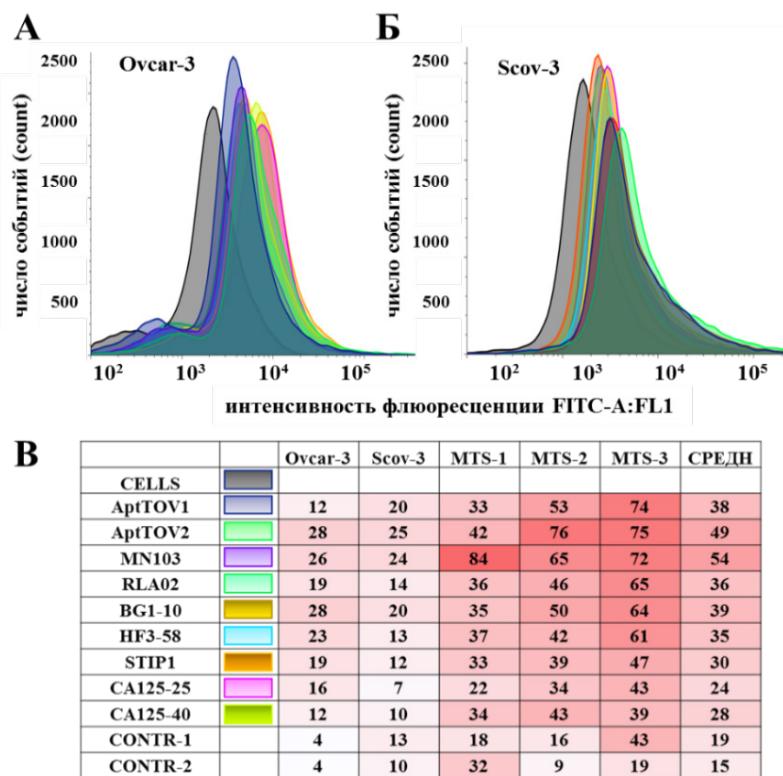


Рис. 1. Сравнительный анализ аффинности аптомеров к клеткам РЯ с помощью проточной цитометрии. Подготовленные растворы аптомеров инкубировали с клетками линий Ovarc-3 (А) и Scov-3 (Б), серый пик — негативный контроль (клетки без аптомеров). (В) Результаты всех экспериментов представлены в виде % позитивных событий относительно контроля (CELLS). Цветовая легенда соответствует графикам (А и Б), образцы: клеточные линии (Ovarc-3, Scov-3) и суспензии клеток, полученные из перitoneальных метастазов РЯ (MTS-1, MTS-2, MTS-3). Для оценки вклада неспецифического взаимодействия ДНК-аптомеров с клеточной поверхностью был проведен анализ двух аптомеров, аффинных к рецептору CD30 (CONTR-1 и CONTR-2)

Fig. 1. Flow cytometric analysis of DNA aptamer binding affinity to ovarian cancer cell models. Representative histograms showing aptamer binding to Ovarc-3 cells (A) and Scov-3 cells (B); the grey peak indicates the negative control (cells without aptamer). (B) Summary of aptamer binding across all tested models. Data are presented as the percentage of positive events relative to the CELLS control. The color legend corresponds to panels A and B. Cell models include the Ovarc-3 and Scov-3 lines, and patient-derived cell suspensions from ovarian cancer peritoneal metastases (MTS-1, MTS-2, MTS-3). Two CD30-targeting aptamers (CONTR-1, CONTR-2) were included to assess non-specific binding

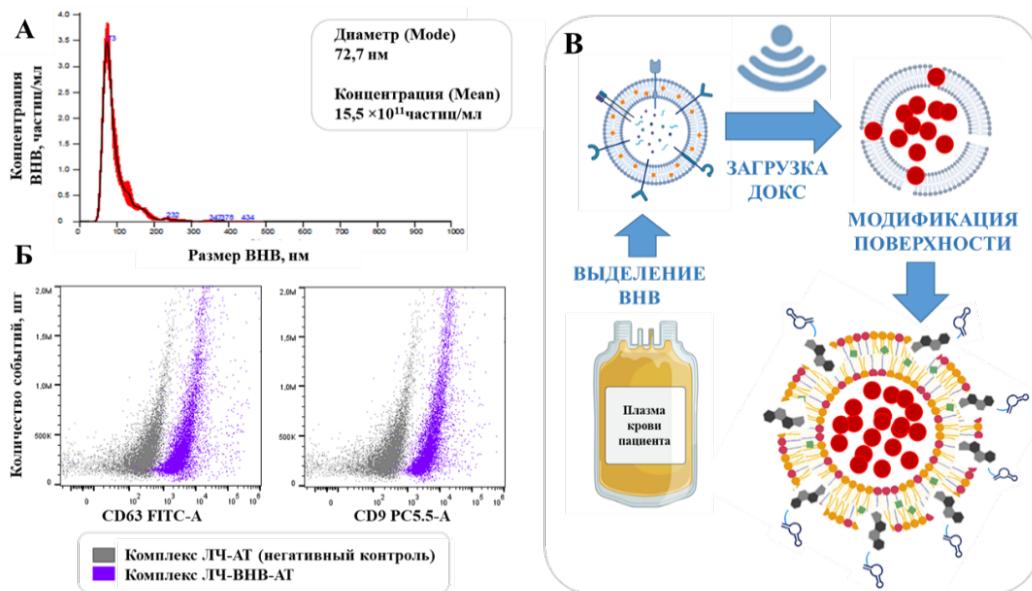


Рис. 2. Характеристика ВНВ, выделенных из плазмы с помощью ультрацентрифугирования: (А) оценка размера и концентрации с помощью анализа траекторий наночастиц, АТН; (Б) оценка экспрессии маркеров CD63 и CD9 с помощью проточной цитометрии с применением латексных частиц. (В) Схема процесса формирования системы доставки (ВНВ-ДОКС-АПТ)

Fig. 2. Characterization of plasma-derived ENVs and schematic of the targeted delivery platform. (A) Nanoparticle tracking analysis (NTA) assessing vesicle size distribution and concentration. (B) Flow cytometric analysis of canonical extracellular vesicle markers (CD63, CD9) using latex bead capture. (B) Schematic illustration of the drug-loaded vesicle (ENV-DOX-APT) delivery system

экспрессия которого не является характерным признаком РЯ. Результаты оценки аффинности этих аптамеров представлены на рис. 1, В: эта аффинность в целом ниже, чем аффинность РЯ-специфичных аптамеров для всех пяти типов клеток. Все, включенные в исследование аптамеры, более аффинно взаимодействовали с клетками перитонеальных метастазов, что может отражать снижение экспрессии специфических маркеров в результате *in vitro* культивации. С клетками линии Ovcar-3 наиболее эффективно взаимодействовали аптамеры AptTOV1, BG1-10 и MN103, с клетками линии Scov-3 — аптамеры AptTOV2, MN103. В целом сравнительный анализ девяти аптамеров не выявил очевидного «фаворита». В правом столбце (рис. 1, В) представлены усредненные показатели аффинности для каждого аптамера: в соответствии с которыми MN103 был выбран для последующих экспериментов.

Выделение и анализ ВНВ

ВНВ были выделены из плазмы здоровых доноров с помощью стандартной технологии ультра-центрифугирования. Определение размера и концентрации ВНВ в каждом образце проводили с помощью АТН. Используемый протокол выделения обеспечивал воспроизводимое получение из 200 мл донорской плазмы гомогенной суспензии ВНВ, объемом 1,5 мл с концентрацией $4 \times 10^{11} - 8 \times 10^{11}$ частиц/мл и размером (гидродинамическим радиусом) мажорной фракции в диапазоне 70–160 нм. Репрезентативный пример результатов АТН представлен на рис. 2, А. Анализ характерных «экзосомальных» маркеров (CD63, CD9) в составе мембранны ВНВ был

проведен с помощью проточной цитометрии (рис. 2, Б).

В целом проведенные исследования характеристик выделенных частиц позволили считать, что это внеклеточные нановезикулы, в состав популяции которых входили так называемые экзосомы.

Формирование комплексов ДОКС-ВНВ

Предполагалось, что технология получения комплексов ДОКС-ВНВ-АПТ должна состоять из трех основных этапов: получение ВНВ из плазмы доноров методом ультра-центрифугирования, загрузки доксорубицина во ВНВ с помощью ультразвука и модификации поверхности ВНВ комплексом Chol-АПТ, схематично представленных на рис. 2, В.

Первые два этапа процесса формирования комплексов были детально проработаны и описаны ранее [17, 20]. Но в рамках пилотного проекта [17] отделение комплексов ДОКС-ВНВ от свободного доксорубицина проводилось путем повторного ультра-центрифугирования и приводило к существенной потере везикул. Поэтому в рамках данного исследования стояла задача адаптации технологии гель-фильтрации, как более «щадящего» и эффективного метода очистки комплексов. С учетом принципов этой технологии, разница скорости седиментации комплексов ДОКС-ВНВ и свободного препарата ДОКС должна обеспечивать их разделение (рис. 3, А).

Колонки были заполнены сефарозой для фильтрации со скоростью потока 1 мл/мин, «появление» ВНВ можно было ожидать в 3–5 фракции фильтрата. В первом эксперименте в колонку был загружен препарат ВНВ (объем:

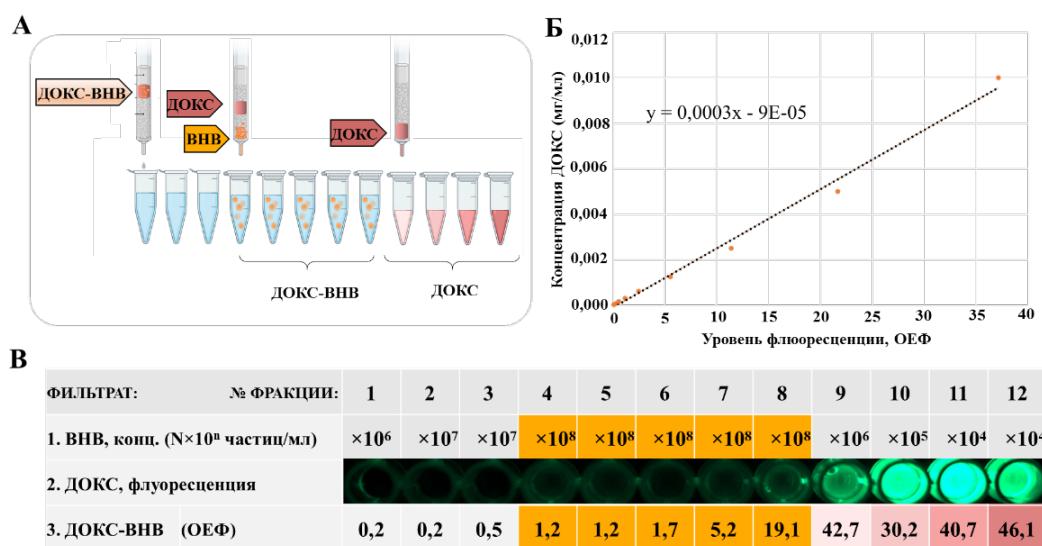


Рис. 3. Очистка комплексов ВНВ-ДОКС с помощью гель-фильтрации. (А) Схема процесса; (Б) график зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала от концентрации ДОКС (калибровочная кривая); (В) результаты гель-фильтрации суспензии внеклеточных нановезикул (ВНВ), раствора доксорубицина (ДОКС) и комплексов ДОКС-ВНВ, полученных с помощью сонопорации

Fig. 3. Purification of DOX-ENV by gel filtration. (A) Schematic of the purification workflow. (B) DOX calibration curve: fluorescence intensity versus concentration. (B) Elution profiles from the gel filtration column for free DOX, unloaded extracellular vesicles (ENV), and the DOX-ENV complexes formed via sonoporation

500 мкл, концентрация: $4\text{--}8 \times 10^{11}/\text{мл}$). Концентрация ВНВ была определена в 12 фракциях с помощью АТН. Результаты, округленные до значений порядков числа везикул/мл, представлены в первой строке рис. 3, В. ВНВ относительно высокой концентрации ($N \times 10^8/\text{мл}$) «выходили» из колонки в 4–8 фракции, что несколько отличалось от данных литературы и могло быть следствием особенностей технологии подготовки ВНВ. Динамика фильтрации доксорубицина была определена в отдельном эксперименте, грубая оценка интенсивности флюоресценции отдельных фракций фильтрата была проведена с помощью системы визуализации iBright CL1500 (Thermo Fisher Scientific, США), результаты также представлены на рис. 3, В. Проведенные измерения показали, что свободный ДОКС «выходит» из колонки в 9–12 фракциях (последующие фракции не анализировали), что подтверждало возможность разделения комплексов ДОКС-ВНВ и свободного препарата.

С учетом эффективности «загрузки» ДОКС в ВНВ [17] и существенного разведения ВНВ в процессе гель-фильтрации, концентрация ДОКС в целевых фракциях фильтрата (4–8) ожидалась относительно низкой. Для точной оценки ожидали низких концентраций ДОКС был проведен анализ серии разведений препарата с помощью планшетного анализатора Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) для построения калибровочной кривой (рис. 3, Б). Затем комплексы ДОКС-ВНВ были подготовлены по разработанной технологии, включая этапы выделения ВНВ, сонопорации и очистки с помощью гель-фильтрации. Результаты измерения интенсивности флюоресценции в полученных фракциях фильтрата представлены на рис. 3, В (третья

строка). Фракции с 4 по 8 были объединены, концентрация доксорубицина, рассчитанная на основе анализа флуоресценции (формула — на рис. 3, Б) в суммарном образце составляла от 4 до 5 мкг/мл ($7\text{--}8,5 \mu\text{M}$).

Цитотоксичность серии разведений полученного препарата была исследована с помощью МТТ-теста. В качестве контроля в эксперимент была включена серия разведений свободного доксорубицина аналогичной концентрации. Результаты представлены на рис. 4.

В результате исследования были воспроизведены ранее полученные на клетках рака молочной железы результаты цитотоксичности свободного и «упакованного» доксорубицина, и показано, что ДОКС-ВНВ оказывает более выраженный цитотоксический эффект, чем ДОКС. Кроме того, проведенный эксперимент показал, что разведение комплекса ДОКС-ВНВ в результате проведения гель-фильтрации не является критичным. Полученный препарат, в котором концентрация ВНВ составляет $4 \times 10^{11} - 8 \times 10^{11}$ частиц/мл, а концентрация доксорубицина соответствует $7\text{--}8,5 \mu\text{M}$, является токсичным для клеток РЯ в условиях *in vitro* эксперимента. На основе полученных результатов была выбрана концентрация, оптимальная для последующего анализа эффекта модификации везикулярной поверхности молекулами антител.

Формирование комплексов ДОКС-ВНВ-АПТ

Технологии модификации везикулярной поверхности основаны на реакциях связывания компонентов мембранных и лигандов, обеспечивающих таргетность системы доставки. Природа связей может быть разной: ковалентные химические связи, аффинные межмолекулярные взаимодействия или ассоциация гидрофобных

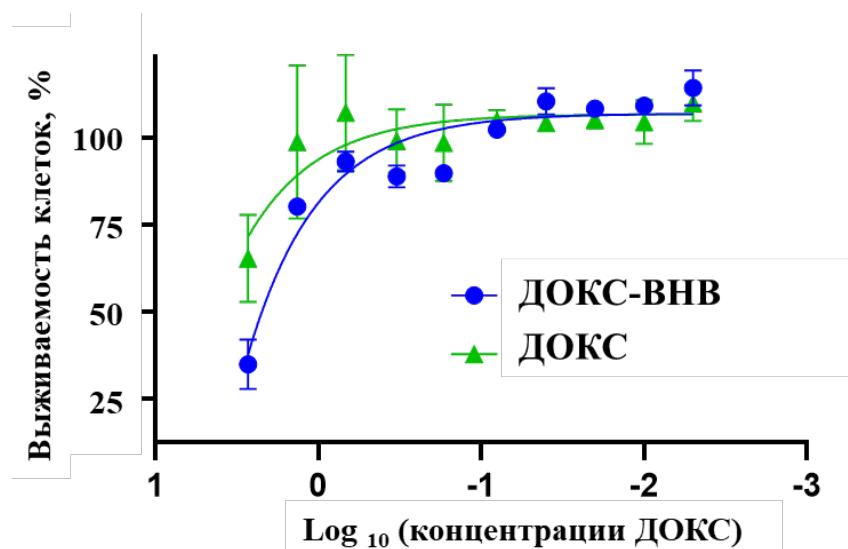


Рис. 4. Результаты сравнительного анализа цитотоксичности свободного доксорубицина (ДОКС) и «загруженного в нановезикулы» (ДОКС-ВНВ) на клетках рака яичника Scov-3 *in vitro* с помощью МТТ-теста

Fig. 4. Comparative analysis of the cytotoxicity of free doxorubicin (DOX) versus drug-loaded extracellular vesicles (DOX-EVs) in Scov-3 ovarian cancer cells *in vitro* using the MTT assay

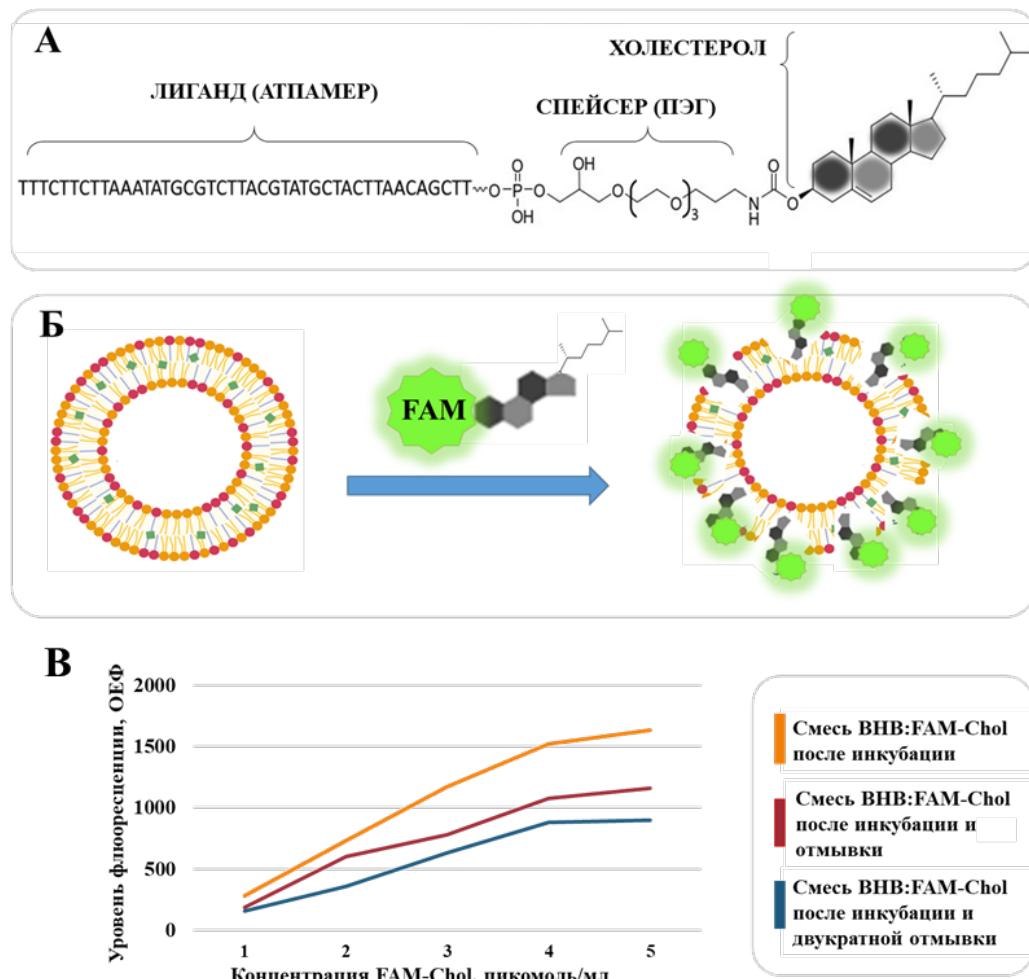


Рис. 5. Принцип модификации везикулярной мембранны ДНК-аптамером (А) химическая структура молекулы лиганда, в состав которой входят аптамер, спейсер (ПЭГ) и холестерол; (Б) схема экспериментов с модельным лигандом (FAM-Chol), проведенных в рамках оптимизации условий реакции. (В) Определение оптимальной (достаточной) концентрации лиганда (FAM-Chol) в реакционной смеси в ходе модификации мембранны ВНВ. Пять вариантов реакционной смеси с разной концентрацией FAM-Chol были приготовлены, инкубация длилась 5 мин. Оценка интенсивности флуоресценции реакционной смеси в ВНВ (отмытых один или два раза) проведена с помощью планшетного анализатора Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США).

Fig. 5. Principle of DNA aptamer modification of the vesicular membrane. (A) Chemical structure of the modular aptamer-ligand construct, comprising a targeting DNA aptamer, a polyethylene glycol (PEG) spacer, and a cholesterol anchor. (B) Schematic of experiments using a fluorescent model ligand (FAM-Chol) to optimize the vesicle surface modification reaction. (B) Determination of the optimal ligand (FAM-Chol) concentration for efficient vesicle functionalization. Five reaction mixtures containing varying ligand concentrations were incubated with extracellular vesicles for 5 minutes. Functionalization efficiency was assessed by measuring the fluorescence intensity of the bulk mixture and of washed once or twice EV fractions using a Varioscan LUX microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA).

компонентов лиганда и везикулярной мембраны [7]. В последнем случае предполагается, что гидрофобная молекула липида, ковалентно связанная с лигандом, «встраивается» в гидрофобный слой липидной мембранны и «служит якорем» для молекулы лиганда, фиксируя ее на везикулярной поверхности. Ранее было показано, что увеличение пространства между лигандом и липидом с помощью инертного «спейсера», например, полиэтиленгликоля (ПЭГ), может обеспечить подвижность и повысить функциональность лиганда [21]. В рамках данного исследования для модификации BHB была синтезирована молекула (MN103-Chol), в состав которой входил выбранный аптамер (MN103) в качестве лиганда, полимер этиленгликоля (ПЭГ) в качестве «спейсера» и холестерин в качестве

гидрофобного «якоря» — структура молекулы схематично представлена на рис. 5, А.

К преимуществам выбранного метода модификации ВНВ можно отнести эффективность и технологичность, а к недостаткам — возможность формирования молекулами липидов мицеллярных структур, симулирующих везикулы, и риск изменения физических характеристик (эластичности) мембранных в результате избытка холестерола в ее составе и, как следствие, снижение стабильности ВНВ. Так, формирование мицелл можно предотвратить путем правильного выбора концентрации (MN103-Chol) в реакционной смеси. А для оценки стабильности ВНВ необходимо провести анализ динамики изменения состава реакционной смеси (формирование и седиментация везикулярных конгломератов).

Для проведения этих экспериментов, принцип которых представлен на рис. 5, Б, использовали молекулу холестерола, конъюгированную с флюоресцеином (FAM-Chol).

В первом эксперименте были сформированы реакционные смеси объемом 500 мкл, содержащие BHB ($4-8 \times 10^{11}$ /мл) и разное количество FAM-Chol (0,2 μ M; 0,4 μ M; 0,6 μ M; 0,8 μ M и 1 μ M). После 5 мин инкубации при комнатной температуре было проведено измерение уровня флюоресценции смеси. Затем модифицированные BHB были отмыты путем ультра-центрифугирования от несвязанных молекул FAM-Chol, ресуспендированы в исходном объеме ФСБ и уровень флюоресценции суспензии BHB был измерен тем же способом. Отмыка и оценка флюоресценции были проведены дважды. Было установлено, что при последовательном повышении концентрации FAM-Chol до 0,8 μ M наблюдается закономерный рост флюоресценции как реакционной смеси, так и отмытых BHB (рис. 5, В). Дальнейшее повышение концентрации FAM-Chol приводило к росту флюоресценции реакционной смеси, но не влияло на уровень флюоресценции отмытых BHB. Был сделан вывод о том, что при концентрации FAM-Chol = 0,8 μ M происходит «насыщение» везикулярных мембран холестеролом, и возникают условия для формирования мицелл из несвязанных молекул. Поэтому концентрация 0,8 μ M была признана оптимальной.

Во втором эксперименте были сформированы реакционные смеси объемом 500 мкл, содержащие BHB и 0,8 μ M FAM-Chol. После инкубации в течение 5, 10, 30 и 60 мин было проведено измерение уровня флюоресценции суспензии BHB и FAM-Chol. Затем отмыка и анализ флюоресценции отмытых BHB были проведены дважды. Полученные результаты показали ста-

бильный уровень флуоресцентного сигнала. Это позволяло признать, что динамическое равновесие в суспензии BHB и FAM-Chol наступает в течение первых 5 мин инкубации и комплексы BHB:FAM-Chol остаются стабильными в течение как минимум часа. Поэтому пятиминутная инкубация была признана достаточной. Так, на основании проведенных экспериментов был сформулирован протокол модификации BHB, который затем был реализован с использованием лиганда MN103-Chol.

Анализ цитотоксичности системы доставки (ДОКС-ВНВ-АПТ)

Последним этапом исследования был сравнительный анализ комплексов ДОКС-ВНВ и ДОКС-ВНВ-АПТ с целью оценки эффекта, который может оказывать модификацию мембранны аптамерами на эффективность системы везикулярной доставки цитостатика. Исследование было проведено с использованием культур клеток РЯ Scov-3 и Ovcar-3. По результатам проточной цитометрии, выбранный аптамер имел «тропность» к мембране этих клеток, что могло повысить эффективность интернализации ВНВ и доставки ДОКС. Концентрация ДОКС в исследуемых препаратах соответствовала ранее определенному значению = 8 μ M.

MTT-тест был проведен аналогично первому эксперименту в трех технических повторах, усредненные результаты были нормализованы относительно уровня метаболической активности контрольных клеток (*non-treated control*). Результаты двух независимых экспериментов представлены на рис. 6.

В использованных экспериментальных условиях адресная система доставки ВНВ-ДОК-АПТ практически полностью ингибирировала рост клеток РЯ, при этом комплексы ВНВ-ДОК показали менее выраженный (особенно на клетках линии

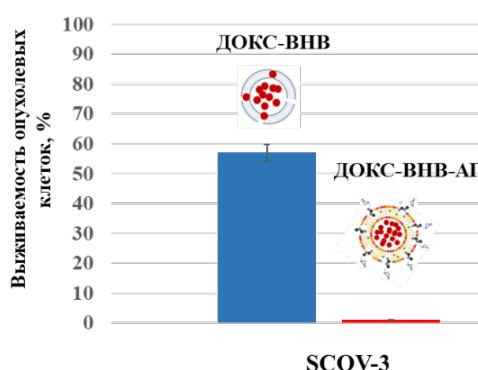


Рис. 6. Результаты исследования цитотоксичности доксорубицина, загруженного в систему доставки ДОКС-ВНВ-АПТ, по сравнению с ДОКС-ВНВ на опухолевых клетках рака яичника Scov-3 и Ovcar-3. Усредненные результаты трех технических повторов представлены как % от выживаемости (метаболической активности) контрольных клеток. На графике представлены стандартные отклонения результатов двух независимых экспериментов

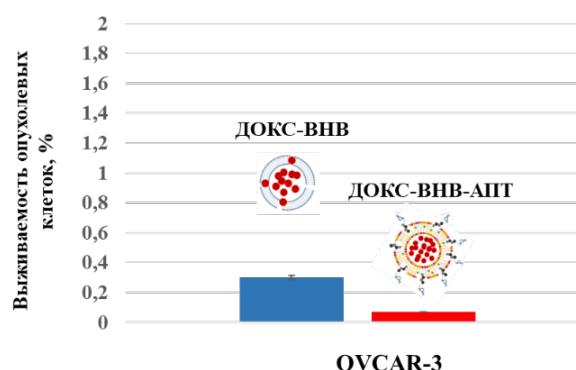


Fig. 6. Enhanced cytotoxicity of aptamer-targeted drug-loaded extracellular vesicles. The cytotoxicity of the targeted (DOX-ENV-APT) and non-targeted (DOX-ENV) doxorubicin delivery systems was compared in Scov-3 and Ovcar-3 ovarian cancer cell lines. Data, expressed as the percentage of cell survival (metabolic activity) relative to untreated controls, are the mean of three technical replicates the standard deviation from two independent experiments are shown on the graph

Scov-3) эффект. Жизнеспособность клеток линии Scov-3 снизилась до 1 % от контрольных значений в результате воздействия комплекса доставки BHB-ДОК-АПТ и лишь до 57 % после воздействия комплексов ДОКС-ВНВ. Для клеток линии Ovcar-3 эти значения составили 0,03 % (BHB-ДОК-АПТ) и 0,3 % (BHB-ДОК) соответственно. Наличие специфичного аптомера в составе везикулярной мембраны очевидно повысило эффективность разработанной системы доставки ДОКС.

Обсуждение

Основным ограничением методов системной цитостатической терапии онкологических заболеваний является токсический эффект, который оказывают цитостатики на делящиеся клетки здоровых тканей. Разработка технологий адресной доставки лекарственных субстанций является одним из способов преодоления этого ограничения. Целью данного исследования была пилотная разработка и тестирование в условиях *in vitro* технологии модификации везикулярной мембранны ДНК-аптамером (АПТ) и оценка эффективности системы адресной доставки комплекса (ДОКС-ВНВ-АПТ) в клетки РЯ. Результаты проведенного исследования показали, что везикулярная мембрана может быть модифицирована ДНК-аптамером с помощью «липидного якоря» и такая модификация повышает цитотоксичность «упакованного» в ВНВ доксорубицина. Это основной вывод, который обосновывает следующие этапы работы. Полученные результаты также указали наиболее актуальные вопросы, которые предстоит решить для создания клинически применимой лечебной технологии.

Во-первых, ранее опубликованные [17] и представленные результаты указывают на относительно низкую эффективность «загрузки» ВНВ доксорубицином. С учетом механизма процесса диффузии препарата через поры везикулярной мембранны и анализа результатов аналогичных исследований (7), существенное улучшение этого показателя представляется маловероятным. Возможным решением проблемы может быть стратегия формирования везикул *de novo* из, например, эритроцитарных мембран. Так, разработка метода увеличения «полезного груза» в составе ВНВ является важным направлением последующих исследований.

Во-вторых, в рамках проведенного исследования не был проведен анализ специфичности взаимодействия комплексов ВНВ-ДОК-АПТ с клетками РЯ. В настоящее время нельзя четко оценить эффект, который оказывает ДНК-аптамер (любой) на поверхности или холестерола в составе везикулярной мембранны, на динамику

взаимодействия ВНВ и клеток. Для определения этого эффекта необходимо проведение дополнительных экспериментов с разными аптомерами и разными клеточными линиями.

В-третьих, рис. 1, В демонстрирует разный профиль сродства протестированных аптомеров к клеткам, полученным из перитонеальных метастазов РЯ. Например, в рамках «терапии» образца MTS-1 максимальную эффективность можно было ожидать от комплексов, модифицированных АПТ-MN103, а в рамках «терапии» образцов MTS-2 или MTS-3 — от комплексов, модифицированных АПТ-AptTOV2. Эти предсказуемое наблюдение отражает известный феномен генетического и фенотипического разнообразия опухолей. Существенно повысить эффективность «таргетирования» опухоли можно путем персонализированного выбора лигандов на этапе формирования терапевтических комплексов BHB-ДОК-АПТ. Реализация этой возможности по средствам технологии направленной селекции аптомеров (SELEX — Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) также представляется значимым направлением последующих исследований.

Заключение

Разработка системы доставки противоопухолевых препаратов на основе ВНВ, модифицированных ДНК-аптамерами, представляется перспективной стратегией повышения эффективности системной химиотерапии. В контексте рака яичника, который имеет характерный паттерн диссеминации, возможность применения инновационной технологии интраперитонеально может быть реализована в обозримом будущем.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Funding

The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией в редакции 2013 г. Пациенты, биологический материал которых был использован, подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2013 revision). All patients provided written informed consent for the use of their biological materials.

Участие авторов

Васильева О.А. — выделение ВНВ из плазмы, сонопорация и модификация везикулярной мембранны FAM-Chol и

АПТ-Chol, эксперименты *in vitro*, подготовка фрагментов текста статьи;
 Каданцева Е.Я. — анализ эффективности взаимодействия аптамеров с клетками рака яичника с помощью проточной цитометрии, подготовка фрагментов текста статьи;
 Гаранин А.Ю. — анализ литературы, выбор аптамеров для тестирования, анализ результатов цитометрии, подготовка фрагментов текста статьи;
 Забегина Л.М. — анализ ВНВ плазмы с помощью проточной цитометрии и анализа траекторий наночастиц, подготовка фрагментов текста статьи;
 Суров Д.А. — получение образцов ткани перitoneальных метастазов РЯ.

Малек А.В. — организация исследования, финальная правка текста статьи.

Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Authors' contributions

Vasilyeva O.A. — plasma EV isolation, sonoporation, vesicular membrane modification (FAM-Chol/APT-Chol), *in vitro* experiments, manuscript drafting;

Kadantseva E.Ya. — flow cytometry analysis of aptamer-ovarian cancer cell interactions, manuscript drafting;

Garanin A.Yu. — literature review, aptamer selection, cytometry data analysis, manuscript drafting;

Zabegina L.M. — plasma EV analysis (flow cytometry, nanoparticle tracking), manuscript drafting;

Surov D.A. — procurement of ovarian cancer peritoneal metastasis tissue samples;

Malek A.V. — study coordination, final manuscript editing.

All authors contributed equally to the publication and approved the final version.

Благодарности

Настоящая публикация выполнена при поддержке Акционерного общества «Омутнинская научная опытно-промышленная база» (АО «ОНПБ»), предоставившего субстанцию Доксорубицина гидрохлорида. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам АО «ОНПБ» за безвозмездную поддержку научного проекта.

Acknowledgements

This work was supported by Omytninskaya Scientific Experimental and Industrial Base JSC (JSC “ONOPB”), which provided the doxorubicin hydrochloride substance. The authors thank the management and staff of JSC “ONOPB” for their non-commercial support of this research.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна. В.В. Старинского. А.О. Шахзадовой. И.В. Лисичниковой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2023; 275(илл.). [Malignant tumors in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Ed. by Kaprin A.D., Starinskii V.V. Shakhzadova A.O., Lisichnikova I.V. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute — branch of the Federal State Budgetary Institution ‘NMRC of Radiology’ of the Ministry of Health of Russia. 2023; 275(ill.) (In Rus)].
2. Мерабишвили В.М. Выживаемость онкологических больных. Выпуск второй. Часть 1. Под ред. проф. Ю.А. Щербука. СПб. 2011; 332.-ISBN: 978-5-91258-176-2. [Merabishvili V.M. Survival of cancer patients. Issue 2. Part 1. Ed. by Prof. Shcherbuk Yu.A. St Petersburg. 2011; 332.-ISBN: 978-5-91258-176-2 (in Rus)].
3. Мерабишвили В.М., Бахидзе Е.В., Урманчева А.Ф., et al. Состояние онкологической помощи в России: рак яичников, распространенность, качество учета, выживаемость больных (клиническо-популяционное исследование). *Voprosy Onkologii*. 2025; 71(2): 306-317.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2025-71-2-306-317>. [Merabishvili V.M., Bakhidze E.V., Urmanceva A.F., et al. Cancer care in Russia: ovarian cancer, prevalence, registration quality, survival (clinical and population study). *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2025; 71(2): 306-317.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2025-71-2-306-317> (In Rus)].
4. Тюляндина А.С., Коломиец Л.А., Морхов К.Ю., et al. Рак яичников, первичный рак брюшины и рак маточных труб. *Злокачественные опухоли*. 2023; 13(3s2-1): 201-215.-DOI: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-201-215>. [Tyulyandina A.S., Kolomiyets L.A., Morhov K.YU., et al. Ovarian cancer, primary peritoneal cancer, and fallopian tube cancer. *Malignant Tumors*. 2023; 13(3s2-1): 201-215. DOI: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-201-215> (In Rus)].
5. Wang G., Yang H., Wang Y., Qin J. Ovarian cancer targeted therapy: current landscape and future challenges. *Front. Oncol.* 2025; 15.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1535235>.
6. Саевец В.В., Привалов А.В., Важенин А.В., et al. Роль гипертермической внутрибрюшинной химиотерапии в комбинации с интраперitoneальной порт-системой в лечении пациенток с распространенными формами рака яичников. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2021; 17(4): 66-73.-DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-4-66-73>. [Saeverts V.V., Privalov A.V., Vazhenin A.V., et al. Role of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in combination with an intraperitoneal port system in the treatment of patients with advanced ovarian cancer. *Opukholi Zhenskoy Reproduktivnoy Sistemy = Tumors of Female Reproductive System*. 2021; 17(4): 66-73.-DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-4-66-73> (In Rus)].
7. Плевако Д.С., Гаранин А.Ю., Васильева О.А., Малек А.В. Везикулярные системы доставки противоопухолевых лекарственных субстанций. *Российские нанотехнологии*. 2025; 20(3). (Принята в печать). [Plevako D.S., Garanin A.Yu., Vasilyeva O.A., Malek, A.V. Vesicular delivery systems for antitumor drug substances. *Nanotechnology Reports*. 2025; 20(3) (in print) (In Rus)].
8. Takakura Y., Matsumoto A., Takahashi Y. Therapeutic application of small extracellular vesicles (SEVs): pharmaceutical and pharmacokinetic challenges. *Biol Pharm Bull*. 2020; 43: 576-583.-DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00831>.
9. Feng C., Xiong Z., Wang C., et al Folic acid-modified exosome-PH20 enhances the efficiency of therapy via modulation of the tumor microenvironment and directly inhibits tumor cell metastasis. *Bioact Mater*. 2021; 6: 963-974.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.09.014>.
10. Kim M.S., Haney M.J., Zhao Y., et al. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*. 2018; 14: 195-204.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.011>.
11. Liu Y., Hinnant B., Chen S., et al. Hyaluronic acid-modified extracellular vesicles for targeted doxorubicin delivery in hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res*. 2024; 443: 114332.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.114332>.
12. Choi E.S., Song J., Kang Y.Y., Mok H. Mannose-modified serum exosomes for the elevated uptake to murine dendritic

- cells and lymphatic accumulation. *Macromol Biosci.* 2019; 19.-DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.201900042>.
13. Jia G., Han Y., An Y., et al. NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials.* 2018; 178: 302-316.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.029>.
 14. Schleif R. DNA LOOPING. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61: 199–223.-DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.001215>.
 15. Irvine D., Tuerk C., Gold L. Selexion: systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *J Mol Biol.* 1991; 222: 739-761.-DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90509-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90509-5).
 16. Cesarini V., Appleton S.L., de Franciscis V., Catalucci D. The recent blooming of therapeutic aptamers. *Mol Aspects Med.* 2025; 102: 101350.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2025.101350>.
 17. Плевако Д.С., Гаранин А.Ю., Васильева О.А., et al. Сравнительный анализ методов формирования и цитостатической активности везикулярной формы доксорубицина. *Российские нанотехнологии.* 2025; 20(3) (принята в печать). [Plevako D.S., Garanin A.Yu., Vasilyeva O.A., et al. Comparative analysis of methods of formation and cytostatic activity of the vesicular form of doxorubicin. *Nanotechnology Reports.* 2025; 20(3) (in print) (In Rus)].
 18. Katsuba K.E., Zabegina L.M., Plevako D.S., et al. Targeting HER2 with DNA aptamers for efficient anticancer drug delivery: A combined experimental and computational study. *Bioconjug Chem.* 2025; 36: 1180-1196.-DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5c00022>.
 19. Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., et al. Elevated levels of serum exosomes in patients with major depressive disorder. *Neurochem J.* 2019; 13: 385-390.-DOI: <https://doi.org/10.1134/S1819712419040044>.
 20. Shtam T., Evtushenko V., Samsonov R., et al. Evaluation of immune and chemical precipitation methods for plasma exosome isolation. *PLoS One.* 2020; 15: e0242732.-DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242732>.
 21. Wan Y., Wang L., Zhu C., et al. Aptamer-conjugated extracellular nanovesicles for targeted drug delivery. *Cancer Res.* 2018; 78: 798-808.-DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2880>.

Поступила в редакцию / Received / 20.10.2025

Прошла рецензирование / Reviewed / 08.12.2025

Принята к печати / Accepted for publication / 18.12.2025

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Олеся Александровна Васильева / Olesya A. Vasilyeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-2201-5796>.
 Екатерина Ярославовна Кадантцева / Ekaterina Ya. Kadantseva / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-7238-5870>.

Александр Юрьевич Гаранин / Alexandre Yu. Garanin / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8313-3794>.

Лидия Михайловна Забегина / Lidia M. Zabegina / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0827-1641>.

Дмитрий Александрович Суров / Dmitry A. Surov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4519-0018>.

Анастасия Валерьевна Малек / Anastasia V. Malek / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>.

