

Материалы и методы

Образцы ткани перитонеальных метастазов серозного РЯ были получены от трех пациенток в ходе циторедуктивных операций. Фрагменты ткани солидной структуры размером 5–7 мм без признаков некроза или кровоизлияний были подвергнуты механической дезинтеграции и фильтрации через клеточные сита с размером пор 50 мкм. Клеточный детрит был отделен от клеток путем центрифугирования (1000 g — 5 мин — 4 °C), клетки дважды промыты фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Осадок, полученный после второго центрифугирования был ресуспендирован в 10 % растворе диметилсульфоксида в ФСБ, медленно заморожен и хранился при -80 °C до использования. Время от получения материала до заморозки клеточной суспензии не превышало шесть часов. В работе были использованы культуры клеток РЯ Scov-3 и Ovcar-3. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки (Компания «Пан-Эко», Москва, РФ) и амикацина 100 мг/л (ОАО «Синтез», Курган, РФ) в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂). Образцы плазмы были получены от здоровых доноров в отделении переливания крови ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. В соответствии с ПП № 331 от 12.04.2013, контейнеры с плазмой, соответствующие требованиям безопасности, но не востребованные для клинических целей, были разморожены при 4 °C и использованы для выделения ВНВ. Субстанция гидрохлорида доксорубицина была предоставлена АО «Омутнинская научная опытно-промышленная база» (Кировская область, п. Восточное, Россия).

ДНК-аптамеры. Выбор аптамеров, использованных в работе, был основан на результатах исследований, авторы которых применяли тех-

нологию SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) и клетки РЯ в качестве мишени секции. Например, в исследовании Dimitri Van Simaeys [1] было показано, что аптамеры AptTOV1 и AptTOV2 аффинно и относительно специфично взаимодействуют с клетками TOV-21G (ovarian clear cell adenocarcinoma). Maryam Nabavinia [2] и соавт. показали, что аптамер MN103 эффективно связывается с клетками линии A2780 (endometrioid adenocarcinoma tumors). Lien-Yu Hung и соавт. [3] сравнили аффинность ряда аптамеров к клеткам, выделенным из разных типов РЯ, и показали аффинное взаимодействие аптамера BG1-10 с клетками BG-1 (serous ovarian cancer). Gregory Benedetto [4] и соавт. разработали аптамер RLA02, аффинный к клеткам Caov-3. Аптамер HF3-58 был выбран на основе аффинности к клеткам A2780, резистентных к паклитакселу [5]. Молекулярные мишени перечисленных аптамеров не известны, но можно предполагать, что эти аптамеры могут обеспечить адресную доставку ВНВ к клеткам РЯ. Молекулярные мишени других аптамеров известны: STIP1 [1, 6], CA125 [6, 7]. В табл. 1 представлены последовательности выбранных аптамеров.

Синтез и очистка (ВЭЖХ) ДНК-аптамеров были проведены АО «ГенТерра» (Москва, Россия), лиофилизаты были растворены в воде, аликовотированы и хранились при -20 °C. Синтез аптамеров, модифицированных флуоресцином (FAM) или холестеролом (MN103-chol), был выполнен ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Проточная цитометрия была использована для анализа сродства ДНК-аптамеров, меченных флуоресцеином (FAM), к поверхности клеток РЯ в соответствии с ранее описанным протоколом [8]. В экспериментах использовали буфер для связывания (БДС), состав которого оптимизировал формирование внутримолекулярных комплементарных связей. БДС готовили в виде

Таблица 1. Последовательности выбранных аптамеров
Table 1. Nucleotide sequences of selected aptamers

Название/ Aptamer	Последовательность нуклеотидов/Nucleotide Sequence	Ссылка/ Reference
AptTOV1	atccagagtgcgcagcagatctgtgttaggatcgcaagtgtggacattactggctcgacacgggtggctta	[1]
AptTOV2	atccagagtgcgcagcataatctctacaggcgcatgtaatataatgaaggcacctggacacgg tggctta	[1]
MN103	tttcttcataatatgcgtttacgtatgtacttaacagctt	[2]
BG1-10	ggcaggaaagacaaacccggaaaaatccgcacaaaacaactaaaaaaaaaccatggctgtggcgctgtta	[3]
RLA02	ctcctcgactgttaaccacgcagaaggccagagagtagtggcatagtagtcggcagaagcca	[4]
AptTOV6	atccagagtgcgcagcaggcactctttgttaagtggctgtcttaaccttcatgcacacgggtggctta	[6]
HF3-58	ttggagcagcggtggaggatgtttccgaccgtgtcggttataacgcgtgtcc	[5]
CA125-40	tatcaattacttacccttagtggtgatgtcgatggat	[7]
STIP1	cggcactcaactttgttaagtggctgtcttaacctca	[7]
CA125-25	ttatcgacgacagtcatcctacac	[8]

пятикратной смеси: 25 mM HEPES, 5,3 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 145 mM NaCl, 0,05 mg/mL yeast t-RNA, pH 7,4. В исследовании использовали суспензии клеток двух линий (Scov-3 и Ovcar-3) и суспензии клеток, полученные из образцов перитонеальных метастазов РЯ (n = 3). Клетки линий Scov-3 и Ovcar-3 выращивали до конфлюэнтности 70–80 %, снимали с помощью механического скребка. Суспензии клеток, полученные из перитонеальных метастазов, быстро размораживали и трижды отмывали от диметилсульфоксида в ФСБ. Подсчет подготовленных клеток проводили с помощью счетчика, TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad, США). Для минимизации неспецифической адсорбции ДНК-аптамеров на клеточной поверхности подготовленные клетки (100 000) инкубировали в 1 мл в блокирующем буфере (10 % фетальной бычьей сыворотки в ФСБ) при постоянном перемешивании (30 мин — 4 °C). Несвязанные с клеточной поверхностью компоненты сыворотки дважды отмывали ФСБ. Равнодействующие FAM-меченные аптамеры в 1-кратном БДС (0,1 мл — 500 pM), инкубировали при условиях диссоциации всех комплементарных связей (5 мин — 95 °C), затем охлаждали до 4 °C, что обеспечивало формирование межмолекулярных связей и пространственную организацию молекул. Суспензию клеток (1 мл) и раствор аптамеров (0,1 мл) смешивали и инкубировали (90 мин — 4 °C) с использованием лабораторного роторатора (500 об/мин). Несвязанные с клеточной поверхностью аптамеры дважды отмывали ФСБ. Интенсивность связывания аптамеров оценивали с помощью цитометра Cytoflex (Beckman Coulter, США). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные в буфере для связывания (без аптамеров).

Выделение ВНВ из плазмы. Медленно размороженную донорскую плазму последовательно центрифугировали (400 g — 20 мин, 800 g — 20 мин, 1500 g — 20 мин, 15000 g — 1,5 ч) при 4 °C. Полученный супернатант фильтровали с помощью фильтрационной системы PES 0,22 мкм (Jet Biofil, Китай), разводили ФСБ в соотношении 1:1, помещали в полипропиленовые пробирки (94 мл, Open-Top Thinwall Polypropylene Tube, кат № 345775) и центрифугировали при 110 000 g — 4 ч (Optima XPN-80, ротор 45 Ti, Beckman Coulter, США). Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ, переносили в пробирки с низкой адгезией (low-protein bind) и хранили при +4 °C в течение 4 дней.

Анализ ВНВ. Размер и концентрацию выделенных ВНВ оценивали методом анализа траекторий наночастиц (ATH). Измерения проводились на анализаторе Nanosight NS300 (Malvern Panalytical, Великобритания). Уровень камеры:

10, пороговый уровень — 6. Каждый образец прокачивался через камеру наблюдения анализатора так, чтобы провести пять измерений на разных микрообъёмах одного и того же образца. Каждое измерение длилось 30 сек, включало 749 кадров. По результатам пяти измерений проводился расчет средних значений размера и концентрации наночастиц в суспензии. Для анализа данных использовали ПО NTA 2.3, поддерживающее работу прибора. Полуколичественный анализ поверхностных «экзосомальных» маркеров (CD63, CD9) проводили с помощью проточной цитометрии. Суспензию ВНВ инкубировали с латексными частицами размером 4 мкм, Sulfate Latex Beads (Invitrogen, США) при постоянном перемешивании (20 мин — 4 °C) для неспецифической абсорбции ВНВ. После отделения несвязанных ВНВ, частицы инкубировали (1 ч — 4 °C) с антителами, меченными красителем FITC (CD63-FITC, Ab18235, Abcam, США) или PE (CD9-PE, 312105, BioLegends, США), отмывали дважды ФСБ (15 мин — 4 °C). Интенсивность связывания антител оценивали с помощью цитометра Cytoflex (Beckman Coulter, США), оборудованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Для анализа данных использовали ПО CytExpert, поддерживающее работу прибора.

Морфологические характеристики ВНВ в рамках данной работы не исследовали. С учетом использования стандартизированной технологии выделения можно предполагать, что структура ВНВ соответствовала ранее опубликованным результатам криоэлектронной [9], сканирующей атомно-силовой [10] и низковольтной электронной [11] микроскопии. 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 проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [13]. Доксорубицин растворяли в физиологическом р-ре (0,9 % NaCl). В экспериментах с ВНВ использовали пробирки с низкой адгезией (low-protein bind). К суспензии ВНВ (объем: 500 мкл, концентрация: 4 × 10¹¹ — 8 × 10¹¹ частиц/мл) добавляли 500 мкл доксорубицина в концентрации 4 мг/мл. Смесь инкубировали (30 мин — 37 °C), затем подвергали воздействию ультразвука (УЗ) в ультразвуковой ванне RK-31 (Bandelin, Германия) при силе тока 0,2 А, при частоте — 35 кГц, мощности УЗ — 160 В, используя циклический режим сонопарации, 4 цикла × УЗ (30 с) — пауза (120 с). Готовые комплексы ДОКС-ВНВ оставляли в течение 30 мин «остыть» при комнатной температуре. Отделение комплексов ДОКС-ВНВ от несвязанного с везикулами препарата проводили методом

гель-фильтрационной хроматографии с использованием гравитационной колонки (Econo-Pac 10 DG, Bio-Rad Laboratories, Inc, США), заполненной 10 мл сефарозы CL-2B (Cytiva, Швеция) и уравновешенной ФСБ [13]. Колонку формировали при скорости фильтрации 1 мл/мин. Образец вносили в подготовленную колонку в объеме 500 мкл, после погружения образца в гель, колонку заполняли ФСБ. Собирали и анализировали 12 фракций фильтрата по 1 мл. Эффективность загрузки доксорубицина оценивали путем анализа флуоресценции при известных длинах волн возбуждения (495 нм) и эмиссии (595 нм) [14, 15] с использованием планшетного анализатора Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США). Для анализа данных использовали ПО SkanIt, поддерживающее работу прибора.

Формирование комплексов ДОКС-ВНВ-АПТ было основано на феномене неспецифического взаимодействия гидрофобных молекул липидов с двуслойной биологической мембраной. Предполагалось, что гидрофобная молекула, связанная с лигандом любой природы, может «встраиваться» в мембрану везикулы в качестве «якоря». В литературе представлены примеры использования разных липидов, включая холестерол [16]. В ходе оптимизации протокола модификации везикулярной мембранны был использован конъюгат холестерола и флуоресцеина (Chol-FAM). После выбора условий реакции суспензию ВНВ (объем: 1 мл, концентрация: $4\text{--}7 \times 10^8$ частиц/мл) объединяли с конъюгатом Chol-АПТ (объем: 10 мкл, концентрация: 100 μM), перемешивали на вортексе в течение 30 сек и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. При выбранных условиях все молекулы конъюгата Chol-АПТ «встраивались» в мембранны ВНВ, поэтому полученную суспензию модифицированных везикул не подвергали очистке и сразу использовали для *in vitro* экспериментов.

Цитотоксичность доксорубицина (свободной формы и в составе везикулярных комплексов) оценивали путем анализа метаболической активности клеток с помощью МТТ-теста (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолия бромида) (TCI-Tokio chemical industry Co, Япония). Клетки Scov-3 и Ovcar-3 высевали в 96-луночный планшет (800 клеток на лунку) накануне эксперимента. Перед анализом эффекта модификации везикулярной поверхности (ДОКС-ВНВ-АПТ) был проведен предварительный эксперимент с целью определения значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) немодифицированных комплексов (ДОКС-ВНВ). Были приготовлены серии разведений ДОКС и суспензии комплексов ДОКС-ВНВ в диапазоне концентраций док-

сорубицина от 1 мМ до 1 пМ. Среда в лунках была замещена подготовленными растворами, каждое разведение тестировали в трех технических повторах. Цитостатический эффект оценивали после 24 ч инкубации с помощью МТТ-теста. После растворения кристаллов формазана в диметилсульфоксиде (ДМСО, Sigma, Германия), анализ абсорбции среды (520 нм) проводили помехой планшетного анализатора Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты трех повторов усредняли, расчет показателей жизнеспособности клеток проводили относительно значения абсорбции формазана — продукта метаболизма клеток при стандартных условиях культивации. С помощью ПО Graph Pad Prism 8 строили графики зависимости % жизнеспособных клеток от концентрации доксорубицина и вычисляли значение IC₅₀. Затем при этой концентрации доксорубицина проводили сравнительный анализ токсичности комплексов «ДОКС-ВНВ» и «ДОКС-ВНВ-АПТ» с помощью аналогичного МТТ-теста.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Van Simaeys D., López-Colón D., Sefah K., et al. Study of the molecular recognition of aptamers selected through ovarian cancer cell-SELEX. Ed. by Neylon C. *PLoS ONE*. 2010; 5(11): e13770.-DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013770>.
- Zhong Y., Zhao J., Li J., et al. Advances of Aptamers Screened by Cell-SELEX in Selection Procedure, Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Anal. Biochem.* 2020; 598: 113620.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113620>.
- Hung L.Y., Wang C.H., Hsu K.F., et al. An on-chip Cell-SELEX process for automatic selection of high-affinity aptamers specific to different histologically classified ovarian cancer cells. *Lab Chip.* 2014; 14(20): 4017-28.-DOI: <https://doi.org/10.1039/c4lc00587b>.
- Benedetto G., Hamp T.J., Wesselman P.J., Richardson C. Identification of epithelial ovarian tumor-specific aptamers. *Nucleic Acid Ther.* 2015; 25(3): 162-72.-DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0522>.
- He J., Wang J., Zhang N., et al. In vitro selection of DNA aptamers recognizing drug-resistant ovarian cancer by cell-SELEX. *Talanta.* 2019; 194: 437-45.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.028>.
- Chen F., Liu Y., Chen C., et al. Respective and simultaneous detection tumor markers CA125 and STIP1 using aptamer-based fluorescent and RLS sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2017; 245: 470-6.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.155>.
- Mansouri Majd S., Salimi A. Ultrasensitive flexible FET-type aptasensor for CA 125 cancer marker detection based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes immobilized onto reduced graphene oxide film. *Anal Chim Acta.* 2018; 1000: 273-82.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.008>.
- 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(6): 1180-96.-DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5c00022>.

9. Shtam T., Naryzhny S., Kopylov A., et al. Functional properties of circulating exosomes mediated by surface-attached plasma proteins. *J Hematol.* 2018; 7(4): 149-53.-DOI: <https://doi.org/10.14740/jh412w>.
10. Slyusarenko M., Nikiforova N., Sidina E., et al. Formation and evaluation of a two-phase polymer system in human plasma as a method for extracellular nanovesicle isolation. *Polymers.* 2021; 13(3): 458.-DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13030458>.
11. Zabegina L., Zyatchin I., Kniazeva M., et al. Diagnosis of prostate cancer through the multi-ligand binding of prostate-derived extracellular vesicles and miRNA analysis. *Life.* 2023; 13(4): 885.-DOI: <https://doi.org/10.3390/life13040885>.
12. 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.(в печати) [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. Russian Nanotechnology 2025; 20 (in print)].
13. 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(4): 385-90.-DOI: <https://doi.org/10.1134/s1819712419040044>.
14. Kauffman M.K., Kauffman M.E., Zhu H., et al. Fluorescence-based assays for measuring doxorubicin in biological systems. *React Oxyg Species.* 2016.-DOI: <https://doi.org/10.20455/ros.2016.873>.
15. Liang J., Zhang Z., Zhao H., et al. Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based time-resolved fluorescence immunoassay. *RSC Ad.* 2018; 8(28): 15621-31.-DOI: <https://doi.org/10.1039/c8ra01807c>.
16. Pi F., Binzel D.W., Lee T.J., et al. Nanoparticle orientation to control RNA loading and ligand display on extracellular vesicles for cancer regression. *Nat Nanotechnol.* 2017; 13(1): 82-9.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0012-z>.