

## АФФИННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКЗОСОМ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Моисеева Е. О.<sup>1</sup>, Кожевникова Д. Д.<sup>1</sup>, Сергеев И. С.<sup>1</sup>,  
Блиндман М. А.<sup>1</sup>, Забонова О. В.<sup>2</sup>, Чернышев В. С.<sup>3</sup>,  
Яковлев А. А.<sup>4</sup>, Горин Д. А.<sup>1</sup>, Ященко А. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук», Москва, Россия

### Контактная информация:

Ященко Алексей Михайлович,  
Сколковский институт науки  
и технологий,  
Большой бул., д. 30, Москва, Россия,  
121205.  
E-mail: a.yashchenok@skoltech.ru

Статья поступила в редакцию 10.10.2024  
и принята к печати 04.12.2024

### Резюме

**Актуальность.** Экзосомы относятся к классу внеклеточных везикул, которые секретируются клетками и циркулируют в биологических жидкостях, опосредуя межклеточную коммуникацию и передачу сигналов в различных патологических процессах, в том числе в модуляции развития раковых опухолей и опухолевого микроокружения. Клетки раковых опухолей продуцируют повышенное количество экзосом уже на начальных стадиях заболевания. Причем характерные для опухоли белковые маркеры могут встречаться в составе генерируемых экзосом, что делает последние перспективным объектом для детекции заболевания методом жидкостной биопсии. Основным препятствием для внедрения экзосом как маркеров развития заболеваний является отсутствие удобного, недорогого и быстрого метода для их выделения и детекции. **Цель.** Разработка платформы для выделения экзосом и детектирования белковых мембранных маркеров, изолированных экзосом. **Материалы и методы.** Разработаны магнитные наночастицы, функционализированные анти-ЕрСАМ аптамером, для избирательного захвата субпопуляции экзосом опухолевых клеток. Эффективность магнитных наночастиц протестирована на экзосомах, полученных из ЕрСАМ-позитивной линии клеток рака кишечника (HT29). Для обеспечения высокой чувствительности анализа экзосом из патологически измененных клеток, везикулы предварительно метили липофильным флуоресцентным красителем (3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин). **Результаты.** Показано, что магнитные наночастицы, связанные с аптамером анти-ЕрСАМ, эффективно захватывали экзосомы из культуральной среды HT29. Методом проточной флуоресцентной цитометрии получен предел обнаружения порядка  $10^7$  экзосом/мл. **Заключение.** Настоящее исследование демонстрирует эффективный метод избирательного выделения экзосом от конкретного типа клеток, перспективный для современной диагностики и мониторинга онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** жидкая биопсия, магнитные наночастицы, магнитная сепарация, малые внеклеточные везикулы, молекулярная диагностика, экзосомы

Для цитирования: Моисеева Е.О., Козhevникова Д.Д., Сергеев И.С. и др. Аффинное выделение экзосом с помощью магнитных наночастиц. *Трансляционная медицина*. 2025; 12(1): 67-79. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-67-79. EDN: TJMXSB

## SPECIFIC ISOLATION OF EXOSOMES USING MAGNETIC NANOSPHERES

Ekaterina O. Moiseeva<sup>1</sup>, Daria D. Kozhevnikova<sup>1</sup>, Igor S. Sergeev<sup>1</sup>, Maria A. Blindman<sup>1</sup>, Olga V. Zaborova<sup>2</sup>, Vasily S. Chernyshev<sup>3</sup>, Alexander A. Yakovlev<sup>4</sup>, Dmitry A. Gorin<sup>1</sup>, Alexey M. Yashchenok<sup>1</sup>

**Corresponding author:**  
Alexey M. Yashchenok,  
Skolkovo Institute of Science and  
Technology,  
Bolshoy Boulevard, 30, p. 1, Moscow,  
Russia, 121205.  
E-mail: a.yashchenok@skoltech.ru

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Received 10 October 2024; accepted  
04 December 2024

### Abstract

**Background.** Exosomes belong to the class of extracellular vesicles that are secreted by cells and circulate in biological fluids, mediating intercellular communication and signaling in various pathological processes, including modulation of cancer development and tumor microenvironment. Exosomes released by cancer cells at early stages of disease progression expressing specific membrane markers, which makes exosomes a promising biomarker of the disease by liquid biopsy. The main obstacle to the use of exosomes as markers of disease development is the lack of a convenient, inexpensive and rapid method for their isolation and detection. **Objective.** The aim of this study was to develop a platform for exosome isolation and detection of exosome protein membrane markers. **Design and methods.** In this work, magnetic nanoparticles functionalized with anti-EpCAM aptamer were developed for selective capture of tumor cell exosomes. The efficiency of magnetic nanoparticles was tested on exosomes derived from EpCAM-positive colon cancer cell line (HT29). To ensure high sensitivity of exosomes from pathologically cells, vesicles were pre-labeled with a lipophilic fluorescent dye (3,3' dioctadecyloxycarbocyanine). **Results.** It was shown that magnetic nanoparticles bound with anti-EpCAM aptamer effectively captured exosomes from the HT29 culture medium. The detection limit of about  $10^7$  exosomes/ml was obtained using flow cytometry method. **Conclusion.** This study demonstrates an effective method for selective isolation of exosomes from cancer cell, which is promising for diagnostics and monitoring of oncological diseases.

**Key words:** exosomes, liquid biopsy, magnetic nanoparticles, magnetic separation, molecular diagnostics, small extracellular vesicles

For citation: Moiseeva EO, Kozhevnikova DD, Sergeev IS, et al. Specific isolation of exosomes using magnetic nanospheres. *Translational Medicine*. 2025; 12(1): 67-79. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-67-79. EDN: TJMXSB

**Список сокращений:** ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия, РЭМ — растровая электронная микроскопия, APTES — 3-аминопропилтриэтоксисилан, BSA — бычий сывороточный альбумин, CANX — кальнексин (интегральный белок эндоплазматической сети), CD9 — мембранный белок семейства тетраспанинов, Cy5 — цианин-5, DIO — 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин, EDX — метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, EpCAM — молекула клеточной адгезии эпителия, FITC — флуоресцеин, GA — глутаровый альдегид, MFI — медиана флуоресценции, MP-SiO<sub>2</sub> — магнитные наночастицы, покрытые диоксидом кремния, NTA — метод анализа траекторий наночастиц, PBS — фосфатно-солевой буфер, SA — стрептавидин.

### Введение

Экзосомы представляют собой стабильные мембранные везикулы размером 30–150 нм, которые секретируются практически всеми клетками во внеклеточное пространство организма [1]. Экзосомы являются посредниками в межклеточной коммуникации, доставляя информацию различного вида (нуклеиновые кислоты, белки, метаболиты и т. д.) к клеткам-реципиентам [2]. Более того, последние исследования показали участие экзосом в ряде биологических процессов в организме человека, таких как иммунный ответ, миграция и дифференцировка клеток, а также метастазирование опухолей [3–5]. Экзосомы несут в своей структуре биохимические маркеры, характерные для родительской клетки, так что, учитывая довольно высокую концентрацию экзосом в биологических жидкостях, таких как моча, кровь, лимфа и др., экзосомы могут стать полезными маркерами онкологических заболеваний [6, 7]. Таким образом, выделение субпопуляций экзосом, продуцируемых патологическими клетками, с последующим анализом их поверхностных маркеров и внутреннего содержимого, внесет существенный вклад в прогресс в области диагностики заболеваний на ранних стадиях и поможет в понимании некоторых фундаментальных вопросов, таких как механизмы образования и секреции экзосом.

Современные методы изучения экзосом активно совершенствуются, тем не менее, получение очищенных и биологически активных экзосом из сложных биологических образцов остается весьма актуальной задачей. Ультрацентрифугирование в настоящее время является золотым стандартом для выделения экзосом из культуральной среды, мочи, плазмы крови и т. д. [8, 9]. Кроме этого метода, для выделения экзосом из различных биоло-

гических образцов зачастую применяется ультрафильтрация и осаждение при помощи полимеров [10]. Однако все перечисленные методы не обеспечивают достаточной для последующего анализа чистоты, влияют на физиологическую активность экзосом, требуют больших затрат труда и времени. Эти недостатки отчасти позволяет преодолеть метод гель-фильтрации [11]. Данный метод, хотя и не требует применения сложных инструментов и не приводит к существенному загрязнению белком или потере физиологической активности экзосом, все еще остается дорогостоящим и трудоемким процессом.

Платформы, основанные на иммуномагнитной сепарации отдельных наночастиц или наноструктур, становятся все более востребованными для получения субпопуляций экзосом с минимальным количеством примесей [12, 13]. Этот подход позволяет непосредственно определять количество экзосом с соответствующими мембранными маркерами и совместим с последующими методами анализа, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или масс-спектрометрия (МС) [14, 15]. Важным преимуществом магнитной сепарации является то, что после выделения экзосомы без дополнительной пробоподготовки могут быть исследованы с помощью стандартных подходов иммунохимического анализа, таких как выявление белковых маркеров, например, тетраспанинов (CD9, CD63, CD81), или сверхэкспрессируемых опухолями белков (EpCAM, HER2, PSMA, CD24) [16–18]. Таким образом, с помощью магнитной сепарации можно одновременно выделять экзосомы и выявлять целевые маркеры. Как правило, аффинное выделение экзосом из биологических жидкостей достигается за счет биоконъюгации магнитных наночастиц с антителами или аптамерами к тетраспанинам, в то время как определение патологических везикул проводится с помощью нацеливания на онкомаркеры, отличающие экзосомы раковых клеток от нормальных.

Проточная цитометрия является мощным и широко используемым методом для рутинного количественного и качественного анализа клеток, поэтому также рассматривается как перспективный подход к исследованию экзосом [19, 20]. Тем не менее, ее прямое применение в отношении экзосом ограничено, так как классическая проточная цитометрия не может адекватно детектировать рассеяние или флуоресценцию частиц размером менее 300 нм.

Таким образом, разработка методов для выделения и фенотипирования экзосом посредством распознавания белковых мембранных марке-

ров экзосом является актуальной и практически важной задачей. Целью настоящей работы стала разработка платформы на основе магнитных наночастиц с функциональной поверхностью, которые способны селективно связывать субпопуляции экзосом, и верификация связывания экзосом с возможностью фенотипирования их мембранных маркеров методом проточной флуоресцентной цитометрии. Для этого были разработаны магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином для иммобилизации биотин-модифицированного анти-ЕрСАМ аптамера, который способен селективно связывать опухолевые экзосомы из культуральной среды. В качестве модели были использованы экзосомы, секретируемые клетками линии рака кишечника HT29. Для обеспечения интенсивного флуоресцентного сигнала экзосомы предварительно помечали липофильным красителем, при этом детектирование патологических везикул осуществлялось посредством стандартной проточной цитометрии. Полученные в работе результаты подтверждают эффективность предложенной методики, которая позволяет провести селективное выделение и количественную оценку экзосом опухолевых клеток.

### Материалы и методы

**Реагенты.** Магнитные наночастицы, покрытые диоксидом кремния, со средним диаметром 300 нм (MP-SiO<sub>2</sub>, TetraQuant, Россия, <https://tetraquant.ru>). Стрептавидин (SA, Carl Roth GmbH, Германия). Бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma-Aldrich, США). Фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4, HIMEDIA, Индия). Этанол (J. T. Baker, США). Липофильный карбоцианиновый краситель 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин (DiO, Lumiprobe, США), 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES, Sigma-Aldrich, США). Глутаровый альдегид (GA, 25 % водный раствор, CDH, Индия). Полисорбат-20 (Sisco, Индия). Мышинные моноклональные антитела LT9 (CD9) (Катал. № 1006а, 100 тестов, ООО «Сорбент», Россия). Антитела антимышине, меченные флуоресцеином (F(ab)<sub>2</sub>-FITC, Катал. № 1050, 500 тестов, ООО «Сорбент», Россия). Поликлональное антитело к MRP1 (CD9) (PAV097Hu01, источник — человек, 100 мкг, Cloud-Clone, КНР). Поликлональное антитело к Calnexin (PAA280Hu01, источник — человек, 100 мкг, Cloud-Clone, КНР). Поликлональное антитело к ErbB2 (ЕрСАМ) (PAV867Hu01, источник — человек, 50 мкг, Cloud-Clone, КНР). Анти-ЕрСАМ аптамер (5'-ag-tga-cgc-agc-atg-cgg-cac-aca-ctt-cta-tct-ttg-cgg-aac-tcc-tgc-gg-3', с биотином на 5 конце и Су5 на 3 конце) («Синтол», Россия). В экспериментах

использовали деионизованную воду, очищенную на системе Millipore Milli-Q (Merck, Германия).

**Синтез аминок-функционализированных магнитных наночастиц (MP-NH<sub>2</sub>).** 30 мг наночастиц MP-SiO<sub>2</sub> суспендировали в 100 мл этанола, куда при интенсивном перемешивании добавляли 1 мл APTES в атмосфере аргона. Затем полученную смесь выдерживали при 60 °С в течение 6 часов. По окончании реакции наночастицы трижды промывали этанолом для удаления избытка APTES, ресуспендировали в воде и хранили при температуре 4 °С.

**Функционализация магнитных наночастиц стрептавидином (MP-SA).** К 1 мг суспензии наночастиц MP-NH<sub>2</sub> в 1 мл воды добавляли 1 мл 25 % раствора глутарового альдегида, после чего полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. По окончании реакции модифицированные наночастицы трижды промывали водой. Затем активированные альдегидной группой наночастицы добавляли к 100 мкг стрептавидина в 1 мл PBS (0,1x) и инкубировали при интенсивном перемешивании при 4 °С в течение 12 часов. Избыток несвязанного белка трижды отмывали PBS, затем наночастицы MP-SA ресуспендировали в PBS (0,1x) и хранили при температуре 4 °С.

**Определение размера и элементный анализ наночастиц.** Размер исследуемых наночастиц определяли с использованием нескольких методов. Изображения растровой электронной микроскопии (РЭМ) наночастиц получены с помощью микроскопа Quattro (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получены с помощью микроскопа Titan (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного приставкой EDX (США). Энергодисперсионный рентгеновский анализ (ЭДС) был выполнен с помощью просвечивающего электронного микроскопа, оснащенного приставками для проведения элементного анализа с использованием методик энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Super-X EDX детектор) и спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (Quantum 965). Дзета-потенциал и размер наночастиц также определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

**Выделение экзосом.** Клеточную линию колоректального рака HT29 выращивали в культураль-

ных флаконах площадью 175 см<sup>2</sup> в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5 % L-глутамин, 1 % пирувата натрия, 1 % пенициллина/стрептомицина и 0,1 % гентамицина. После достижения плотности заполнения, превышающей 90 %, питательную среду заменяли на среду без сыворотки, и клетки помещали в инкубатор на 48 часов. Затем культуральную среду отбирали, центрифугировали 10 минут при 400×g для удаления остатков мертвых клеток. Перед хроматографическим выделением 100 мл среды очищали и концентрировали до объема 500 мкл с помощью ультрафильтрации на фильтрах с размером пор 100 кДа (Millipore, Германия). Выделение экзосом из 500 мкл концентрированной среды осуществляли на коммерческой колонке mini PURE-EVs (HansaBioMed, Эстония). Согласно инструкции производителя, фракции (объем одной фракции ~ 100 мкл) с 1 по 7 исключались из рассмотрения, в то время как фракции с 8 по 14 собирали вместе в новую пробирку для последующего определения концентрации везикул и белка в образце.

**Получение флуоресцентно-меченных экзосом.** Флуоресцентно-меченные экзосомы получали по следующей методике: 200 мкл предварительно выделенных экзосом ( $2 \times 10^{10}$  везикул/мл) в PBS помещали в 0,5 мл пробирку со стенками, инертными к адсорбции белков (Eppendorf LoBind Protein Tube), и добавляли 200 мкл липофильного красителя DiO (40 нмоль в смеси ДМСО:PBS (1:1)), после чего инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Далее образец очищали от избытка красителя на коммерческой колонке miniPURE-EVs (HansaBioMed, Эстония). Согласно протоколу производителя, фракции с 1 по 7 не собирались. Фракции с 8 по 14 помещали отдельно в новую пробирку для последующего анализа. Верификацию встраивания красителя в структуру липидного бислоя экзосом проводили методом флуоресцентной томографии с использованием системы преclinical 2D и 3D визуализации *in vivo* с цифровой микротомографией (микроКТ) (IVIS spectrum CT, PerkinElmer, США). Фракции экзосом с 8 по 14 наносили отдельно (2 мкл) на нитроцеллюлозную мембрану и высушивали перед измерениями. Измерение проводили при длинах волн возбуждения и эмиссии 460 нм и 520 нм соответственно.

**Характеризация экзосомальной фракции.** Размер и концентрацию экзосом оценивали методом анализа траектории наночастиц (NTA) с использованием прибора ZetaView® PMX420-QUATT (Particle Metrix, Германия). Концентра-

цию белка в экзосомальной фракции определяли с помощью бицинхониновой кислоты (набор BCA Protein Assay Kit, FineTest, Китай). Наличие характеристических маркеров экзосом — тетраспанина CD9, EpCAM, и отсутствие кальнексина (CANX) подтверждали методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Bio-Rad, США). Для дот-блоттинга образцы выделенных экзосом наносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью микропипетки. Затем мембраны промывали PBS и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °C с блокирующим буфером (5 % BSA, PBS) и аккуратном перемешивании. Далее для детекции выбранных маркеров (CD9, EpCAM, CANX) мембраны инкубировали с первичными антителами (разведение 1:2500) при температуре 4 °C в течение ночи. После промывки раствором 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA в PBS мембраны инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA в PBS, содержащем вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена, разведенные в соотношении 1:200 000. Затем мембраны промывали и проявляли с использованием субстрата пероксидазы Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Интенсивность люминесценции оценивали на флуоресцентном томографе IVIS Spectrum CT imaging system. Изображения растровой электронной микроскопии (РЭМ) экзосом получены с помощью микроскопа Quattro (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения изображений образцы экзосом помещали на медную сетку с углеродным покрытием и оставляли сушиться на ночь при комнатной температуре. После чего проводили измерения.

**Иммобилизация анти-EpCAM аптамера.** Иммобилизация аптамера с биотином на магнитные наночастицы (MP-SA) осуществляли по следующей методике: 100 мкл MP-SA промывали три раза промывочным буфером (0,1x PBS pH 7,4 и 0,01 % Tween 20). Далее наночастицы ресуспендировали в 500 мкл промывочного буфера и добавляли 500 мкл аптамера (0,2 пикомоль/мкл), после чего инкубировали при комнатной температуре на ротаторе в течение 30 минут. Потом магнитные наночастицы собирали на магнитном штативе и проводили промывку наночастиц от остатков аптамера три раза промывочным буфером. Наночастицы ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера для дальнейших экспериментов. Верификацию посадки аптамера на наночастицы проводили на проточном цитометре, в качестве контроля использовали образец наночастиц без аптамера.

**Иммунохимический анализ экзосом.** Иммуномагнитную изоляцию HT29 экзосом осуществляли по следующей методике: 10 мкл наночастиц MP-SA с анти-ЕрСАМ аптамером помещали в новую пробирку (2 мл, Eppendorf LoBind Protein Tube), после чего добавляли 100 мкл HT29 экзосом различной концентрации. Далее наночастицы и экзосомы инкубировали на термошейкере на 650 об/мин при 4 °С в течение не менее 12 часов. Затем пробирку помещали на магнитный штатив для концентрирования магнитных наночастиц и отбирали надосадочную жидкость (супернатант). После этого наночастицы ресуспендировали в 400 мкл промывочного буфера (0,1x PBS pH 7,4 и 0,01 % Tween 20) и пробирку вновь помещали на магнитный штатив для концентрирования наночастиц, после чего отбирали супернатант и ресуспендировали в 300 мкл промывочного буфера. Затем добавляли в пробирку 30 мкл LT9 антител и инкубировали 45 минут при комнатной температуре на термошейкере на 950 об/мин. Далее наночастицы собирали на магнитном штативе и промывали в 300 мкл промывочного буфера. Процедуру промывки повторяли трижды, после чего наночастицы вновь ресуспендировали в 300 мкл буфера для выделения (0,1x PBS pH 7,4 и 0,1 % BSA), добавляли 50 мкл F(ab)2-FITC антител (разведение 1:100) и инкубировали на термошейкере на 950 об/мин 30 минут. По завершении инкубации наночастицы собирали на магнитном штативе и промывали трижды в 300 мкл промывочного буфера.

Верификацию образования комплекса «магнитная наночастица–экзосома–антитело» проводили на проточном флуоресцентном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для регистрации флуоресцентного сигнала от антител (меченных красителем FITC) использовали канал флуоресценции FITC (длина волны возбуждения 488 нм, длина волны эмиссии 520 нм). Регистрацию флуоресцентного сигнала от аптамера, меченного красителем Cy5 на магнитных наночастицах, проводили в флуоресцентном канале APC (длина волны возбуждения 638 нм, длина волны эмиссии 660 нм). Регистрацию флуоресцентного сигнала от экзосом, меченных липофильным красителем DiO, проводили в канале флуоресценции FITC (длина волны возбуждения 488 нм, длина волны эмиссии 520 нм). Компенсацию и анализ флуоресцентного сигнала (значение MFI) выполняли с использованием программного обеспечения CytExpert.

### Обсуждение и результаты

Магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином (SA), часто используются для магнитной

сепарации биомолекул. В частности, высокоспецифичное взаимодействие SA с биотином стало чрезвычайно полезным инструментом при разработке систем для иммуноаффинного выделения и очистки клеток [21]. Исключительно высокое сродство SA к биотину ( $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$  [22]) является одним из сильнейших известных нековалентных взаимодействий белка с лигандом, что позволяет молекулам, содержащим биотин, селективно связываться с конъюгатами стрептавидина. Данный принцип обеспечивает эффективное выделение целевых молекул без предварительной пробоподготовки из сложных смесей, к которым относятся все биологические жидкости. Биотин — это небольшая молекула, которая при введении в биологически активные макромолекулы, как правило, не влияет на их биологическую активность и на способность меченых белков связываться с антителами или аптамерами. Поскольку биотинилированные аптамеры коммерчески доступны и отличаются низкой стоимостью относительно аналогичных антител, магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином, могут быть легко функционализированы аптамером, специфичным к определенному антигену на поверхности мембраны внеклеточных везикул, что позволяет выделять таргетную фракцию экзосом из общей популяции внеклеточных везикул и проводить дальнейшее фенотипирование выделенных экзосом. Ковалентная иммобилизация SA на поверхность твердых носителей имеет ряд преимуществ, так как образование стабильной химической связи между биомолекулами и наночастицей обеспечивает высокую надежность связывания. Важно отметить, что ориентация SA на поверхности наночастицы несущественно влияет на эффективность мобилизации биотинилированных аптамеров. Дело в том, что стрептавидин представляет собой тетрамерный белок [22] и состоит из четырех эквивалентных субъединиц, поэтому независимо от того, какую конформацию SA примет на поверхности наночастицы, всегда будет оставаться свободный сайт для связывания с биотином.

Существует множество способов ковалентного связывания SA с поверхностью наночастиц, наиболее популярными из них являются реакции аминогрупп, которые в достатке присутствуют в молекулах белков с функциональными группами поверхности, такими как изоцианаты, ацилазиды, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, сульфонил хлориды, альдегиды, эпоксиды и др. [23]. В частности, модификация поверхности с помощью 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES) с последующей активацией глutarовым альде-

гидом (GA) является часто используемым методом иммобилизации белка на различные твердые поверхности [24]. Альдегидные группы быстро и необратимо реагируют с первичными аминогруппами молекулы белка в водной среде при физиологическом pH, поэтому GA широко применяется для конъюгации. Силанизация — это хорошо зарекомендовавшая себя реакция модификации поверхности неорганических наночастиц для последующей иммобилизации белков или молекул нуклеиновых кислот, поэтому на первом этапе для функционализации поверхности оксида кремния свободными аминогруппами мы использовали APTES. После чего для пришивки белка поверхность активируется альдегидными группами путем взаимодействия  $\text{NH}_2$ -групп с GA, при этом одна альдегидная группа связывается с наночастицей, а вторая остается свободной. В результате именно эти альдегидные группы вступают в реакцию с аминогруппами белка. Все стадии иммобилизации стрептавидина на поверхность наночастиц MP-SiO<sub>2</sub> приведены на схеме 1.

В качестве стартового материала были использованы имеющиеся в продаже магнитные наночастицы, покрытые диоксидом кремния, со средним диаметром 300 нм, которые вводили в реакцию силанизации. Магнитные наночастицы, покрытые APTES, представлены на рисунке 1А. Полученные MP-NH<sub>2</sub> имеют сферическую форму и характеризуются наличием зернистого ядра и оболочки (структура ядро-оболочка “core-shell”). Энергодисперсионный (ЭД) анализ показал, что в ядре наночастиц содержится оксид железа, покрытый слоем оксида кремния с небольшим количеством атомов азота и углерода. Согласно ДРС размер наночастиц увеличился с 300 нм для исходных наночастиц до 360 нм для MP-NH<sub>2</sub> (рис. 1Б). Методом электрофоретического рассеяния света (ЭРС)

было показано, что после реакции с APTES наблюдается изменение дзета-потенциала магнитных наночастиц с отрицательного значения (-38 мВ), характерного для оксида кремния, на положительное значение (+32 мВ), свойственное положительному заряду аминогрупп (рис. 1В). Результаты ЭД, ДРС и ЭРС подтверждают успешную функционализацию поверхности диоксида кремния аminosиланом.

Для связывания со стрептавидином наночастицы MP-NH<sub>2</sub> предварительно активировали 2,5 % глутаровым альдегидом, после чего пришивали белок. В результате реакции конъюгации гидродинамический размер увеличился до 400 нм, а дзета-потенциал снова изменился на отрицательный (-12 мВ), что указывает на связывание белка с поверхностью наночастиц, так как при нейтральном или близком к нейтральному pH стрептавидин имеет отрицательный заряд [25]. Дополнительно методом РЭМ (рис. 1Г) показано, что на поверхности и между наночастицами MP-SA наблюдается полимерная оболочка.

Следующим этапом работы явилось исследование возможности применения полученных MP-SA наночастиц для выделения внеклеточных везикул и их фенотипирования. Для связывания экзосом использовали аптамер, специфичный к EpCAM рецептору, поскольку большинство экзосом, секретируемых клетками рака эпителиального происхождения, к которым, в частности, относится рак кишечника, сверхэкспрессируют EpCAM [26]. Такой выбор обеспечивает избирательный захват экзосом опухолевого происхождения с помощью магнитных наночастиц. На рисунке 2 приведены результаты измерения флуоресценции MP-SA наночастиц методом проточной цитометрии до и после инкубации MP-SA с анти-EpCAM аптамером, содержащим биотин на 5' конце и краситель циа-

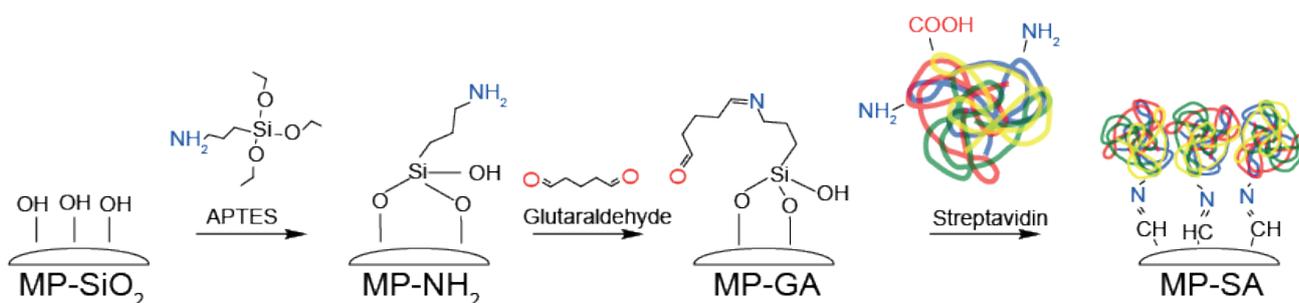


Схема 1. Схематическое изображение получения функционализированных стрептавидином магнитных наночастиц (MP-SA)

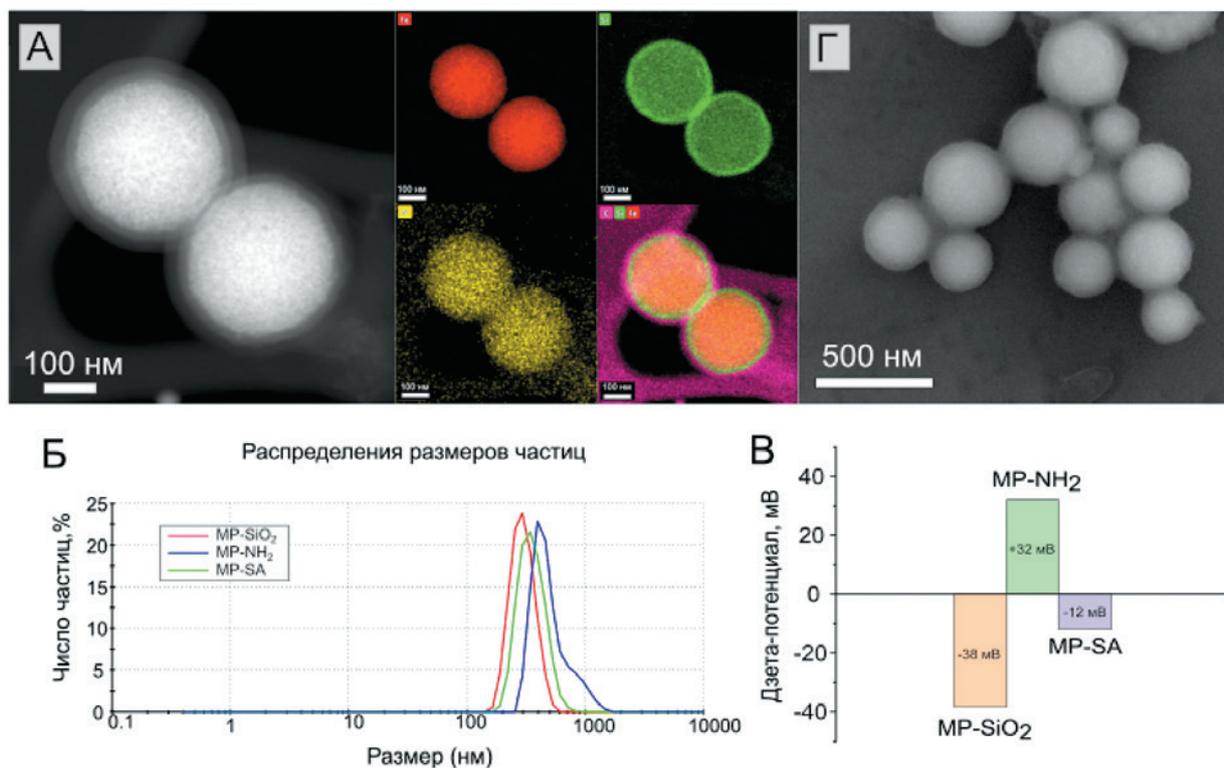
Scheme 1. Schematic representation of the production of streptavidin-functionalized magnetic nanoparticles (MP-SA)

нин-5 (Cy5) на 3' конце. В результате наблюдается 1000-кратное увеличение сигнала флуоресценции при связывании аптамера с MP-SA наночастицами по сравнению с MP-SA наночастицами без аптамера (рис. 1А).

Далее MP-SA наночастицы с анти-ЕpСAM аптамером (MP-Арт) были использованы для выделения экзосом. В работе применялись экзосомы, выделенные методом гель-фильтрации из культуральной среды клеточной линии колоректального рака HT29. Чтобы охарактеризовать экзосомы, необходимо оценить их размер, а также важно продемонстрировать экспрессию распространенных экзосомальных белков-маркеров. На рисунке 2Б представлена диаграмма распределения размера полученных экзосом клеточной линии HT29. Средний диаметр экзосом составил  $168 \pm 24$  нм. Концентрация экзосом в образце:  $1,4 \pm 0,4 \times 10^{10}$  везикул в мл. Концентрация белка в образце составила  $20 \pm 4$  мкг в мл. На рисунке 2В приведены ПЭМ изображения выделенных HT29 экзосом, анализ которых показал, что экзосомы имеют типичную однородную морфологию округлой фор-

мы с характерной границей липидного бислоя. Мембранные рецепторы HT29 экзосом определяли методом дот-блоттинга (рис. 2Б, вставка). Данные дот-блоттинга свидетельствуют о присутствии характеристичного экзосомального маркера — CD9, а также показывают высокую экспрессию ЕpСAM. Следует отметить, что тетраспанин CD9 является одним из наиболее распространенных белков экзосом, что подтверждает селективность процедуры выделения. Отрицательный результат дот-блоттинга на Calnexin (белок эндоплазматического ретикулума) свидетельствует об отсутствии в образце иных везикул эндосомального происхождения. Полученные результаты подтверждают чистоту экзосомальной фракции и успешное выделение экзосом из культуральной среды HT29.

Фенотипирование экзосом по мембранным маркерам является одной из важных задач для количественного анализа или детектирования субпопуляций экзосом. Поэтому следующим этапом работы стало исследование возможности захвата HT29 экзосом MP-Арт наночастицами за ЕpСAM рецептор, с последующим детектирова-



**Рис. 1. Характеризация полученных магнитных наночастиц**

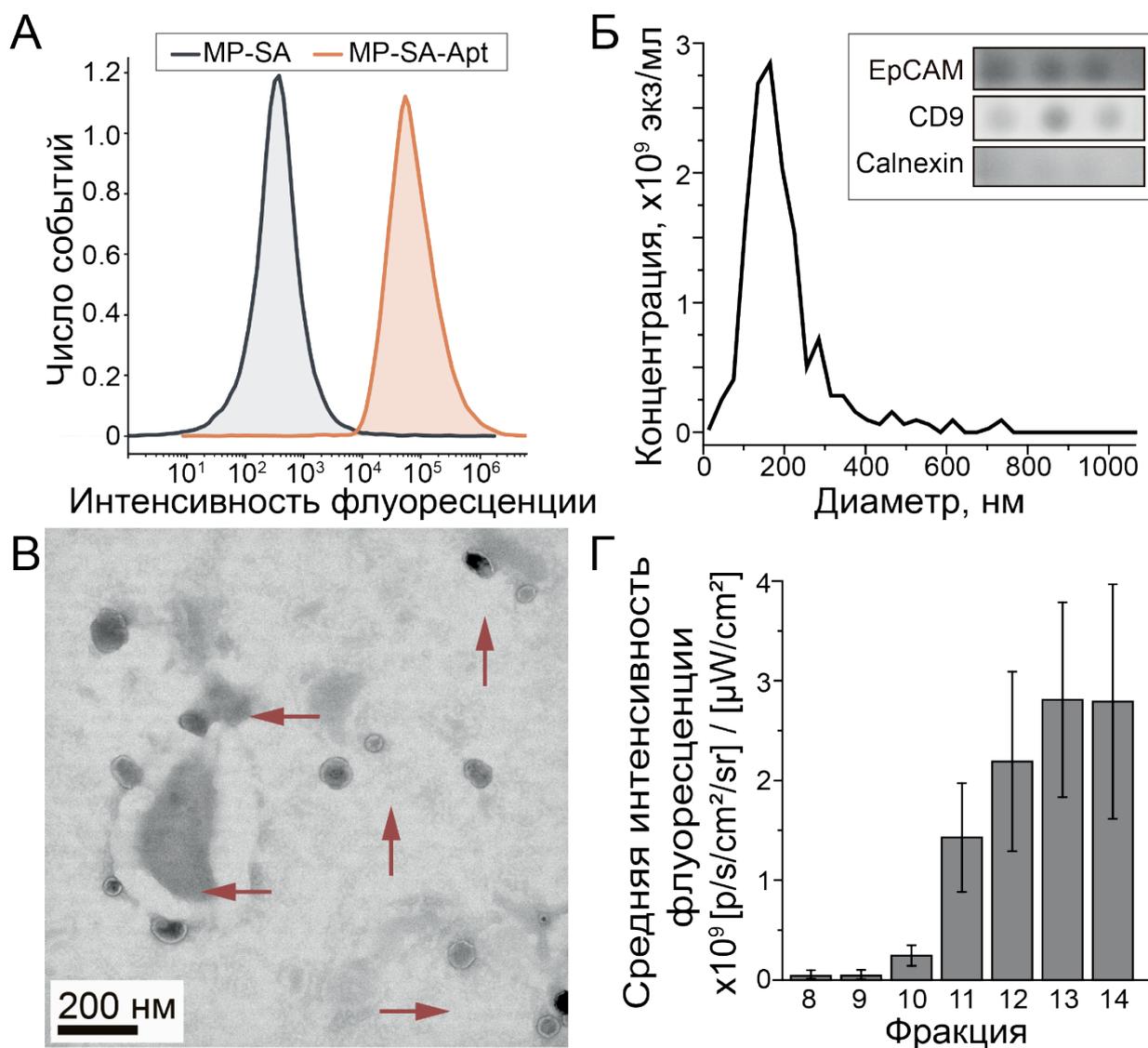
ПЭМ-изображения (А), гидродинамический диаметр (Б) и дзета-потенциал (В), РЭМ-изображение (Г) магнитных наночастиц.

**Figure 1. Characterization of the obtained magnetic nanoparticles**

TEM images (A), hydrodynamic diameter (B) and zeta potential (C), SEM image (D) of magnetic nanoparticles.

нием второго мембранного рецептора с помощью антител. В качестве такого рецептора был выбран белок CD9 — классический экзосомальный маркер. На рисунке 3А представлены графики интенсивности флуоресценции магнитных наночастиц, функционализированных анти-EpCAM аптамером после связывания экзосом и окрашивания

антителами. Данные показывают слабое увеличение сигнала флуоресценции по сравнению с фоном, в присутствии экзосом по сравнению с контрольным экспериментом. При этом наблюдается устойчивый тренд на рост сигнала флуоресценции по мере увеличения количества экзосом. Далее была исследована возможность захвата и фено-



**Рис. 2. Характеризация полученных экзосом**

Сигнал флуоресценции Cy5 MP-SA наночастиц до и после связывания с биотинилированным Cy5-меченным анти-EpCAM аптамером (А); распределение гидродинамического диаметра (Б); ПЭМ изображения (стрелками показаны экзосомы) (В) экзосом, выделенных из клеточной культуры HT29 колоректального рака. Вставка: дот-блоттинг экзосом HT29. Результаты флуоресцентного анализа очищенных на chromatографической колонке и нанесенных на нитроцеллюлозную мембрану экзосом, меченных липофильным красителем DiO (Г).

**Figure 2. Characterization of the obtained exosomes**

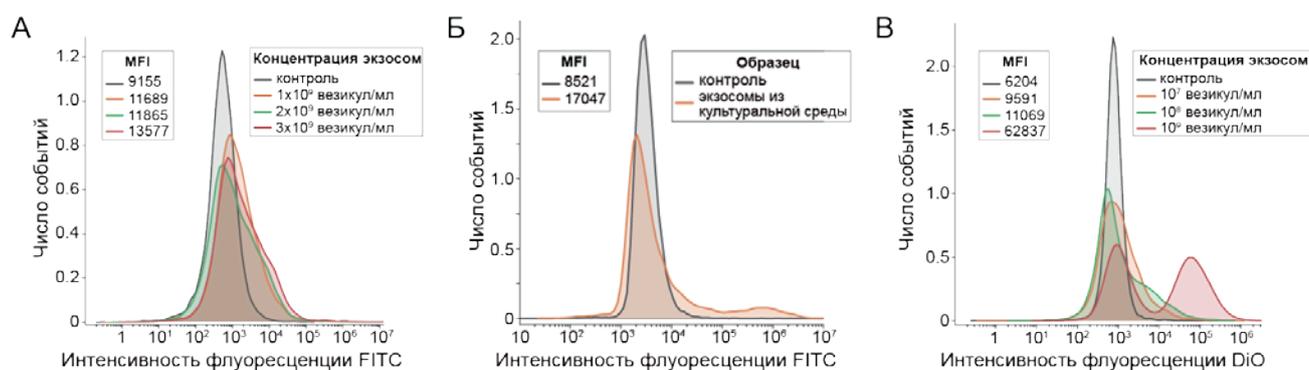
Cy5 MP-SA Fluorescence Signal of Nanoparticles Before and After Binding to Biotinylated Cy5-Labeled Anti-EpCAM Aptamer (A); distribution of hydrodynamic diameter (B); TEM images (arrows show exosomes) (C) exosomes isolated from HT29 colorectal cancer cell culture. Insert: HT29 exosome dot pillbox. Results of fluorescence analysis purified on a chromatographic column and deposited on the nitrocellulose membrane by exosomes labeled with lipophilic dye DiO (G).

типирования экзосом непосредственно из культуральной среды без предварительной очистки (рис. 3Б). После инкубации наночастиц MP-SA-Apt с первичными антителами к CD9 и вторичными антителами, меченными FITC, также наблюдается увеличение сигнала флуоресценции по сравнению с фоном. Причем интенсивность флуоресценции оказалась выше, чем при анализе выделенных экзосом HT29 с максимальной концентрацией ( $10^9$  везикул в мл). Тем не менее, полученный сигнал все еще оставался низким. Полученные результаты могут быть обусловлены недостаточным количеством свободных сайтов связывания из-за стерических ограничений, так как поверхность наночастиц может препятствовать связыванию антитела с маркером экзосом. Также невысокая чувствительность метода затрудняет определение малых концентраций экзосом.

Чтобы усилить флуоресцентный сигнал экзосом на магнитных наночастицах и обеспечить надежное количественное определение экзосом опухолевых клеток, выделенные экзосомы были модифицированы флуоресцентным липофильным карбоцианиновым красителем. 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин (DiO) представляет собой симметричную молекулу, состоящую из двух ароматических цианиновых фрагментов, содержащих

по одной алкильной цепи  $C_{18}$ , которые и обеспечивают высокую липофильность. Этот краситель, наряду с другими представителями семейства липофильных карбоцианиновых красителей, широко используется для окрашивания клеточных мембран [27]. На рисунке 2Г представлены результаты флуоресцентного анализа фракций (8–14) экзосом после их инкубации с красителем DiO с последующей очисткой на хроматографической колонке. Из проведенных измерений видно, что основная часть флуоресцентно-меченных экзосом находится во фракциях с 11 по 14. На рисунке 2Б также приведены средние значения интенсивности флуоресцентного сигнала для каждой из фракций, которые также подтверждают, что наиболее интенсивный сигнал флуоресценции наблюдался для фракций экзосом с 11 по 14. Таким образом, для последующих экспериментов по взаимодействию экзосом с MP-SA-Apt использовали объединенные фракции экзосом с 11 по 14.

Для оценки эффективности предложенного метода окрашенные липофильным красителем экзосомы от HT29 инкубировали с MP-SA-Apt и проводили анализ интенсивности флуоресценции методом проточной цитометрии. На рисунке 3В представлен график флуоресцентного сигнала меченных DiO HT29 экзосом, связанных с MP-SA-



**Рис. 3. Графики интенсивности флуоресценции FITC магнитных наночастиц, полученные при помощи проточной цитометрии**

Сигнал флуоресценции MP-SA-Apt после инкубации с различным количеством экзосом, выделенных из клеток HT29 (А) и с экзосомами концентрированной культуральной среды клеток HT29 без предварительной очистки (Б), с последующей инкубацией с первичным мышинным анти-CD9 антителом и FITC-меченным вторичным мышинным антителом. Сигнал флуоресценции MP-SA-Apt после инкубации с различным количеством окрашенных липофильным красителем экзосом, выделенных из клеток HT29 (В). На вставке слева даны значения MFI.

**Figure 3. Fluorescence intensity plots of FITC magnetic nanoparticles obtained using flow cytometry**

Fluorescence signal of MP-SA-Apt after incubation with a different number of exosomes isolated from HT29 cells (A) and with exosomes of concentrated HT29 cell culture medium without prior purification (B), followed by incubation with primary murine anti-CD9 antibody and FITC-labeled secondary murine antibody. MP-SA-Apt fluorescence signal after incubation with varying numbers of lipophilic dye-stained exosomes isolated from HT29(B) cells. The inset on the left shows the MFI values.

Арт. Показано, что при увеличении концентрации экзосом в диапазоне  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  везикул в мл наблюдается постепенное увеличение сигнала флуоресценции. При количественном анализе максимальной из исследуемых концентраций везикул в мл —  $10^9$ , получено 100-кратное увеличение сигнала флуоресценции по сравнению с фоном. Стоит отметить, что при анализе наименьшей концентрации везикул сигнал также был выше фонового, поэтому нижний предел обнаружения флуоресцентных экзосом для данного эксперимента составил  $10^7$  везикул в мл. Следовательно, на основании полученных результатов можно заключить, что предложенный метод прямого захвата предварительно окрашенных экзосом значительно увеличивает чувствительность метода проточной цитометрии при анализе специфических маркеров, по сравнению с сэндвич-вариантом. Данный факт, вероятно, обусловлен более высокой концентрацией липофильного красителя в липидном бислое экзосом. В клеточную мембрану может встроиться множество молекул липофильного красителя [28], в то время как оптимальным количеством красителя, которое возможно ввести в молекулу антитела без потери аффинности, считается от 4 до 8 [29]. Поэтому с учетом малого количества доступных специфических рецепторов, вероятно, в случае окрашивания липофильным красителем липидного бислоя, количество ответственных за сигнал флуорофоров на иммобилизованных везикулах оказывается выше.

### Заключение

Таким образом, в данном исследовании разработана методика селективного захвата опухолевых экзосом и их количественного анализа с помощью флуоресцентной проточной цитометрии. Полученные магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином, образуют устойчивый комплекс с биотинилированным анти-ЕрСАМ аптамером и эффективно захватывают экзосомы из культуральной среды клеток рака кишечника HT29. Проведена количественная оценка экзосом, окрашенных липофильным красителем, с помощью проточного цитометра. Показано успешное определение окрашенных ЕрСАМ-положительных экзосом в диапазоне концентраций  $10^7$ – $10^9$  везикул/мл. Данный подход потенциально может быть распространен на исследования экзосом в образцах биологических жидкостей, таких как кровь, слюна или моча. Дополнительно в подходе вместо аптамера могут быть применены первичные антитела, конъюгированные с биотином. Предложенная методика может расширить текущие возможности

по применению жидкостной биопсии и анализа экзосом в качестве циркулирующих онкомаркеров и позволит упростить диагностику онкологических заболеваний на ранних стадиях.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Благодарности / Acknowledgement

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00022, <https://rscf.ru/project/23-74-00022/>.

Исследование методом АНТ проводилось с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука». / The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 23-74-00022, <https://rscf.ru/project/23-74-00022/>. The ANT study was carried out using the equipment of the MSU CCP “Technologies for obtaining new nanostructured materials and their comprehensive study”, acquired by MSU under the instrument base upgrade program as part of the national Science project.

### Список литературы / References

1. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581–593. DOI: 10.1038/nri2567.
2. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255–289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
3. Ridder K, Keller S, Dams M, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol.* 2014;12(6):e1001874. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001874.
4. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012;18(6):883–891. DOI: 10.1038/nm.2753.
5. Tenchov R, Sasso JM, Wang X, et al. Exosomes — nature’s lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano.* 2022;16(11):17802–17846. DOI: 10.1021/acsnano.2c08764.
6. Yang L, Jia J, Li S. Advances in the application of exosomes identification using surface-enhanced Raman spectroscopy for the early detection of cancers.

Front Bioeng Biotechnol. 2022;9:808933. DOI: 10.3389/fbioe.2021.808933.

7. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177–182. DOI: 10.1038/nature14581.

8. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2:20360. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.

9. Chen BY, Sung CWH, Chen C, et al. Advances in exosomes technology. *Clin Chim Acta*. 2019;493:14–19. DOI: 10.1016/j.cca.2019.02.021.

10. Sunkara V, Park J, Han J, et al. Exosome precipitation by ionic strength modulation: ExoPRISM. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023;15(12):56807–56819. DOI: 10.1021/acsami.3c12345.

11. Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, et al. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145686. DOI: 10.1371/journal.pone.0145686.

12. Yashchenok AM, Chernyshev VS, Konovalova EV, et al. Anti-CD63-oligonucleotide functionalized magnetic beads for the rapid isolation of small extracellular vesicles and detection of EpCAM and HER2 membrane receptors using DARPIn probes. *Anal Sens*. 2023;3:e202200059. DOI: 10.1002/anse.202200059.

13. Boriachek K, Islam MN, Gopalan V, et al. Quantum dot-based sensitive detection of disease specific exosome in serum. *Analyst*. 2017;142(12):2211–2219. DOI: 10.1039/C7AN00672A.

14. Chang M, Wang Q, Qin W, et al. Rational synthesis of aptamer-functionalized polyethylenimine-modified magnetic graphene oxide composites for highly efficient enrichment and comprehensive metabolomics analysis of exosomes. *Anal Chem*. 2020;92(22):15497–15505. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03405.

15. Chen S, Shiesh SC, Lee GB, et al. Two-step magnetic bead-based (2MBB) techniques for immunocapture of extracellular vesicles and quantification of microRNAs for cardiovascular diseases: A pilot study. *PLoS ONE*. 2020;15(12):e0229610. DOI: 10.1371/journal.pone.0229610.

16. Li Q, Lv M, Lv L, et al. Identifying HER2 from serum-derived exosomes in advanced gastric cancer as a promising biomarker for assessing tissue HER2 status and predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy. *Cancer Med*. 2023;12(4):4110–4124. DOI: 10.1002/cam4.5289.

17. Runz S, Keller S, Rupp C, et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol*. 2007;107(3):563–571. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.08.064.

18. Kawakami K, Fujita Y, Kato T, et al. Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies. *Sci Rep*. 2021;11:15000. DOI: 10.1038/s41598-021-94532-7.

19. Li W, Shao B, Liu C, et al. Noninvasive diagnosis and molecular phenotyping of breast cancer through microbead-assisted flow cytometry detection of tumor-derived extracellular vesicles. *Small Methods*. 2018;2(10):1800122. DOI: 10.1002/smt.201800122.

20. Suárez H, Gámez-Valero A, Reyes R, et al. A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2017;7:11271. DOI: 10.1038/s41598-017-11264-3.

21. Dose C, Huppert V, Kauling B, et al. Multisort cell separation method. US Patent 10,123,456, filed 15 March 2018, and issued 6 November 2018.

22. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem*. 1991;37(5):625–636. DOI: 10.1093/clinchem/37.5.625.

23. Hermanson GT. The reactions of bioconjugation. In: *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed. Academic Press. 2013:229–258. ISBN: 978-0-12-382239-0.

24. Vashist SK, Lam E, Hrapovic S, et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem Rev*. 2014;114(21):11083–11130. DOI: 10.1021/cr5000943.

25. van Oss CJ, Giese RF, Bronson PM, et al. Macroscopic-scale surface properties of streptavidin and their influence on aspecific interactions between streptavidin and dissolved biopolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2003;30(1–2):25–36. DOI: 10.1016/S0927-7765(03)00029-5.

26. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019;3(6):165–180. DOI: 10.15698/cst2019.06.189.

27. Unthank JL, Lash JM, Nixon JC, et al. Evaluation of carbocyanine-labeled erythrocytes for microvascular measurements. *Microvasc Res*. 1993;45(2):193–210. DOI: 10.1006/mvre.1993.1019.

28. Zou P, Chen H, Paholak HJ, et al. Noninvasive fluorescence resonance energy transfer imaging of in vivo premature drug release from polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2013;10(11):4185–4194. DOI: 10.1021/mp400502y.

29. Haugland RP. Antibody conjugates for cell biology. *Curr Protoc Cell Biol*. 2000;6:16.15.1–16.15.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb1605s00.

#### Информация об авторах:

Моисеева Екатерина Олеговна, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Кожевникова Дарья Дмитриевна, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Сергеев Игорь Сергеевич, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Блиндман Мария Александровна, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Заборова Ольга Владимировна, к.х.н., старший научный сотрудник, химический факультет, ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

Чернышев Василий Сергеевич, к.т.н., заведующий лабораторией, ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Яковлев Александр Александрович, д.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»;

Горин Дмитрий Александрович, д.х.н., профессор, Сколковский институт науки и технологий;

Яценко Алексей Михайлович, д.ф.-м.н., доцент, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий».

#### **Authors information:**

Ekaterina O. Moiseeva, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Daria D. Kozhevnikova, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Igor S. Sergeev, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Maria A. Blindman, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Olga V. Zaborova, PhD (Chem.), Senior Researcher, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University;

Vasiliy S. Chernyshev, PhD (Tech.), Head of Laboratory, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Alexander A. Yakovlev, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences;

Dmitry A. Gorin, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Alexey M. Yashchenok, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Associate Professor, Skolkovo Institute of Science and Technology.