

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-90

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАХВАТА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ
МАГНИТНЫМИ МИКРОСФЕРАМИ, ПОКРЫТЫМИ ДУБИЛЬНОЙ КИСЛОТОЙ*****INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF EXTRACELLULAR VESICLE CAPTURE
BY MAGNETIC MICROSPHERES COATED WITH TANNIC ACID**Е. О. Моисеева¹, В. С. Чернышёв², А. М. Яценюк¹¹Сколковский институт науки и технологий, Москва²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, МоскваE. O. Moiseeva¹, V. S. Chernyshev², A. M. Yashchenok¹¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow²Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology
and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

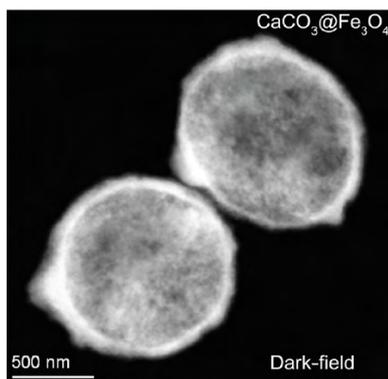
✉ a.yashchenok@skoltech.ru

Аннотация

Микросферы карбоната кальция, загруженные наночастицами магнетита, получены для выделения внеклеточных везикул (EVs) из биологических жидкостей. Для направленного захвата EVs поверхность магнитных микросфер покрыта дубильной кислотой методом послойной сборки. Магнитные микросферы использованы для выделения EVs из среды для культивирования клеток. Количественные данные показали, что была достигнута эффективность улавливания 60 %.

Abstract

Calcium carbonate microspheres loaded with magnetite nanoparticles are designed for isolation of extracellular vesicles (EVs) from biological fluids. The surface of magnetic microspheres is then coated with tannic acid by a layer-by-layer method, which induces EV capture on magnetic microsphere. The magnetic microspheres were applied to isolate EVs from cell culture media. The quantitative data revealed that 60 % capture efficiency was achieved.



ПЭМ-изображение магнитных микросфер (MMS) [3]

Выделяемые клетками мембранные везикулы микро- и наноразмера чаще всего называют внеклеточными везикулами (EVs). Известно, что EVs участвуют во многих физиологических процессах, включая возникновение и прогрессирование различных патологических процессов, в том числе онкологических заболеваний [1]. Однако выделение EVs из сложных биологических жидкостей с высоким выходом и достаточной чистотой остается сложной задачей. Стандартные методы (ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, хроматография, осаждение) являются трудоемкими, требуют применения дорогостоящих приборов или приводят к загрязнению EVs. Магнитная сепарация широко распространена для выделения биомолекул и имеет большой потенциал для выделения EVs, так как характеризуется доступностью и обеспечивает высокую эффективность.

В данной работе магнитные микросферы (MMS) получены путем адсорбции наночастиц оксида железа (Fe_3O_4) в поры карбоната кальция (CaCO_3) методом кристаллизации из раствора (*freezing-induced loading*, FIL) [2]. Микрофотографии MMS, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), приведены на рисунке. Поверхность

MMS загруженных Fe_3O_4 покрывали дубильной кислотой (ТА) методом послойного нанесения (LbL), где в качестве связующего полиэлектролита использовали поливинилпирролидон (PVP), бычий сывороточный альбумин (BSA) или поли(аллиламин гидрохлорид) (ПАН).

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ (№ 23-74-00022).
© Е. О. Моисеева, В. С. Чернышёв, А. М. Яценюк, 2024

Показано, что связывание EVs с поверхностью магнитных микросфер (MMS) происходит за счет взаимодействия дубильной кислоты и мембраны везикул. Согласно данным спектроскопии ядерно-магнитного резонанса, ТА связывается с фосфолипидами за счет водородных связей и путем образования катион-π комплекса между бензольным кольцом галловой кислоты и четвертичным амином холинового остатка. Более того, масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) подтвердила, что белки, встроенные в мембрану, также могут образовывать комплекс с ТА.

Чтобы оценить эффективность выделения EVs из биологических образцов, были использованы EVs, находящиеся в супернатанте клеточной линии рака толстой кишки человека HCT116. Эффективность разработанной методики была оценена с использованием количественных и качественных методов анализа, таких как анализ траекторий наночастиц (NTA), определение содержания белка (BCA) и сканирующая электронная микроскопия (SEM). Разработанная методика имеет высокий потенциал применения, так как продемонстрировала сравнимую с гельпроникающей хроматографией (SEC) эффективность выделения EVs.

Литература

1. Becker A. et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis // *Cancer Cell*. 2016. Vol. 30, No. 6. P. 836–848.
2. German S. V. et al. High-efficiency freezing-induced loading of inorganic nanoparticles and proteins into micron- and submicron-sized porous particles // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, No. 1. P. 17763.
3. Grishaev N. A. et al. Studying the small extracellular vesicle capture efficiency of magnetic beads coated with tannic acid // *J. Mater. Chem. B*. 2024.