

<https://doi.org/10.33878/2073-7556-2025-24-4-92-105>



AuNP-аптасенсор: новая технология жидкостной биопсии для диагностики колоректального рака

Шаронова Т.В.¹, Каданцева Е.Я.¹, Кацуба К.Е.¹, Служев М.И.¹, Коваленко И.М.¹, Семиглазова Т.Ю.¹, Васильев А.В.¹, Буровик И.А.¹, Димитриади Т.А.^{2,3}, Мазовка К.Е.³, Мкртчян Л.С.³, Бурцев Д.В.^{2,3}, Малек А.В.¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Ленинградская ул., д. 68, пос.Песочный, г. Санкт-Петербург, 197758, Россия)

²Государственное автономное учреждение Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр» (ул. Пушкинская, д. 127, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия)

³ФГБОУ ВО «Ростовский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России (пер. Нахичеванский, д. 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, Россия)

РЕЗЮМЕ

ЦЕЛЬ: разработка и апробация нового метода диагностики колоректального рака (КРР) путем полуколичественного анализа специфических популяций внеклеточных нановезикул (ВНВ) плазмы с помощью технологии AuNP-аптасенсора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: в исследовании были использованы образцы плазмы пациентов с колоректальным раком ($n = 37$), пациентов с болезнью Крона ($n = 10$) и здоровых доноров ($n = 32$). Исследование стандартных характеристик ВНВ было проведено с помощью анализа траекторий наночастиц (АТН) и проточной цитометрии; характеристик наночастиц золота — с помощью лазерной корреляционной и абсорбционной спектроскопии. Полуколичественный анализ специфических популяций ВНВ в составе плазмы доноров и пациентов был проведен с помощью технологии AuNP-аптасенсора, предполагающей колориметрический метод оценки результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ: разработаны и протестированы AuNP-аптасенсоры на основе девяти различных ДНК-аптамеров. Показано увеличение количества КРР-специфичных ВНВ в плазме пациентов с КРР по сравнению с плазмой доноров и пациентов с болезнью Крона. После проведенной оптимизации показателей диагностической значимости AuNP-аптасенсора составили: AUC — 0,95, специфичность — 88,89%, чувствительность — 90,63%. В группе пациентов с КРР показана корреляция между размерами опухоли и результатами, полученными с помощью AuNP-аптасенсора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: оценка количества КРР-специфичных ВНВ плазмы при помощи технологии AuNP-аптасенсор является перспективным методом диагностики КРР.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аптамер, аптасенсор, внеклеточные нано-везикулы, золотые наночастицы, диагностика, колоректальный рак

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ: исследования проводились в рамках выполнения государственного задания «Разработка и клиническая апробация тест-системы для диагностики онкологических заболеваний органов желудочно-кишечного тракта на основе технологии AuNP-аптасенсора», регистрационный номер 1023022000032-9.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Шаронова Т.В., Каданцева Е.Я., Кацуба К.Е., Служев М.И., Коваленко И.М., Семиглазова Т.Ю., Васильев А.В., Буровик И.А., Димитриади Т.А., Мазовка К.Е., Мкртчян Л.С., Бурцев Д.В., Малек А.В. AuNP-аптасенсор: новая технология жидкостной биопсии для диагностики колоректального рака. *Колопроктология*. 2025; т. 24, № 4, с. 92–105. <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2025-24-4-92-105>

Diagnostics and monitoring of colorectal cancer with AuNP-APTASENSOR

Tatiana V. Sharonova¹, Ekaterina Ya. Kadantseva¹, Konstantin E. Katsuba¹, Irina M. Kovalenko¹, Maksim I. Sluzhev¹, Tatiana Yu. Semiglazova¹, Dmitriy V. Burtcev^{2,3}, Tatiana A. Dimitriadi^{2,3}, Karina E. Mazovka³, Lilit S. Mkrтчian³, Aleksandr V. Vasilev¹, Ilia A. Burovik¹, Anastasia V. Malek¹

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (Leningradskaya st., 68, village Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia)

²State Autonomous Institution of the Rostov Region “Regional Consultative and Diagnostic Center” (Pushkinskaya st., 127, Rostov-on-Don, 344000, Russia)

³The Rostov State Medical University (Nakhichevskiy Lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia)

ABSTRACT *OBJECTIVE:* to develop and validate a novel method for diagnosing colorectal cancer (CRC) by semi-quantitative analysis of specific populations of plasma small extracellular nanovesicles (SEVs) using AuNP-aptasensor technology.

MATERIALS AND METHODS: the study used plasma samples from patients with colorectal cancer ($n = 37$), patients with Crohn's disease ($n = 10$), and healthy donors ($n = 32$). Investigation of standard SEVs characteristics was performed using nanoparticle tracking analysis (NTA) and flow cytometry; gold nanoparticle characteristics were analyzed using dynamic light scattering (DLS) and absorption spectroscopy. Semi-quantitative analysis of specific SEVs populations was performed using AuNP-aptasensor technology, employing a colorimetric method for result evaluation.

RESULTS: AuNP-aptasensors based on nine different DNA aptamers were developed and tested. An increase in the number of CRC-specific SEVs in the plasma of patients with CRC was shown compared to the plasma of donors and patients with Crohn's disease. Optimized AuNP-aptasensor revealed following indicators of diagnostic significance: AUC — 0,95, specificity — 88,89%, sensitivity — 90,63%. In the group of patients with CRC, the correlation between tumor size and the results obtained using the AuNP-aptasensor was evaluated.

CONCLUSION: assessing the quantity of CRC-specific plasma SEVs using AuNP-aptasensor technology is a promising method for diagnosing CRC.

KEYWORDS: aptamer, aptasensor, extracellular nanovesicles, gold nanoparticles, diagnostics, colorectal cancer

CONFLICT OF INTEREST: the authors declare no conflict of interest

FINANCING: the studies were conducted as part of the state assignment “Development and clinical testing of a test system for diagnosing oncological diseases of the gastrointestinal tract based on AuNP-aptasensor technology”, registration number 1023022000032-9.

FOR CITATION: Sharonova T.V., Kadantseva E.Y., Katsuba K.E., Kovalenko I.M., Sluzhev M.I., Semiglazova T.Yu., Burtcev D.V., Dimitriadi T.A., Mazovka K.E., Mkrtchian L.S., Vasilev A.V., Buravik I.A., Malek A.V. Diagnostics and monitoring of colorectal cancer with AuNP-APTASENSOR. *Koloproktologia*. 2025;24(4):92–105. (in Russ.). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2025-24-4-92-105>

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ: Малек Анастасия Валерьевна, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, Ленинградская ул., д. 68, Санкт-Петербург, Россия; 197758; тел +7-960-250-46-80; e-mail: anastasia@malek.com.ru

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Anastasia V. Malek, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Leningradskaya st., 68, St. Petersburg, Russia; 197758; e-mail: anastasia@malek.com.ru

Дата поступления — 06.05.2025

Received — 06.05.2025

После доработки — 01.09.2025

Revised — 01.09.2025

Принято к публикации — 10.11.2025

Accepted for publication — 10.11.2025

ВВЕДЕНИЕ

Поздняя диагностика онкологических заболеваний является одним из основных факторов высокой онкологической смертности. Колоректальный рак (КРР) не является исключением из этого правила: Рисунок 1 демонстрирует соотношение между стадией впервые поставленного диагноза и выживаемостью пациентов с КРР, полученное на основе данных Популяционного ракового регистра Санкт-Петербурга [1].

Методы диагностики КРР постоянно развиваются, включая технологии анализа маркеров различной природы в стуле или плазме, эндоскопии и лучевой диагностики. Интересно, что авторы обзорных статей, публикуемых в англоязычных [2–4] и отечественных [5,6] изданиях, сходятся в выводах о перспективности технологий мультиплексной жидкостной биопсии. Этот подход является одним из возможных решений известной проблемы низкой специфичности

индивидуальных молекулярных маркеров. В целом, несмотря на активные научные исследования и расширение мер профилактики [7], среднегодовой темп снижения смертности от рака прямой кишки, ректосигмоидного соединения и ануса за период 2013–2023 гг. составил всего 1,22%; изменения аналогичного показателя по раку ободочной кишки оказались в пределах статистической погрешности [8]. Представленные данные указывают на низкую эффективность существующих диагностических методов, необходимость поиска принципиально новых маркеров и разработки соответствующих аналитических технологий.

Внеклеточные нановезикулы (ВНВ) — это наноразмерные мембранные «пузырьки», которые секретируются живыми клетками во внеклеточную среду. ВНВ присутствуют в большинстве биологических жидкостей, включая плазму, могут поглощаться клетками и, таким образом, опосредовать межклеточный

транспорт веществ [9]. В состав везикулярной мембраны входят белки, участвующие в их формировании (так называемые «экзосомальные» маркеры Cd63, Cd9, Cd81) и гистоспецифичные маркеры, характерные для клеток-продуцентов. Аденокарцинома, как наиболее частый вариант КРР, является дифференцированной опухолью, сохраняющей признаки исходного железистого эпителия. Логично предполагать, что клетки аденокарциномы толстой кишки секретируют во внеклеточное пространство ВНВ, имеющие в составе мембраны маркеры кишечного эпителия. В ранее проведенных исследованиях мы подтвердили это предположение, показав, что развитие аденокарциномы толстой или прямой кишки сопровождается повышением в плазме концентрации ВНВ, мембрана которых содержит маркеры нормального кишечного (железистого) эпителия (CLRN3, GPA33, GCNT3, PIGY, REG4) [10,11]. Анализ этих изменений имел диагностический потенциал, но использованная технология на основе проточной цитометрии оказалась недостаточно чувствительной. Использование ВНВ в качестве диагностических маркеров требовало разработки принципиально новых аналитических подходов.

Аптамеры представляют собой одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, имеющие стабильную трехмерную структуру и способные прочно связываться со специфическими молекулярными мишенями [12]. Метод поиска аптамеров, связывающих определенные мишени, предполагает использование синтетической библиотеки из миллионов разных молекул

ДНК, из которой итеративно отбираются и амплифицируются молекулы с нужными характеристиками — Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, SELEX [13]. Таким образом были, например, получены ДНК-аптамеры, специфично взаимодействующие с маркерами на поверхности различных линий клеток КРР [14–16]. Феномен специфического взаимодействия аптамеров с маркерами в составе везикулярной мембраны лежит в основе инновационной технологии анализа ВНВ-аптасенсинга [17]. Специфичность таких методов определяется свойствами аптамеров, а чувствительность может быть обеспечена различными методами детекции (флуоресценция, электрохимия, люминесценция, колориметрия, поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние, поверхностный плазмонный резонанс). Предел обнаружения ВНВ для некоторых аптасенсоров достигает 10^2 – 10^3 везикул/мл, что предполагает высокую чувствительность и большой диагностический потенциал [17].

Феномен обратимого угнетения фермент-миметической (пероксидазной) активности (ФМА) наночастиц золота лежит в основе аптасенсора, который мы разработали ранее и протестировали на модели лимфомы Ходжкина [18,19]. Принцип этой технологии схематично представлен на рисунке 2.

Неспецифичная абсорбция ДНК-аптамеров на поверхности наночастиц золота (AuNP) обратимо блокирует их пероксидазную активность. После добавления в реакцию смесь ВНВ, происходит специфичное взаимодействие ДНК-аптамеров

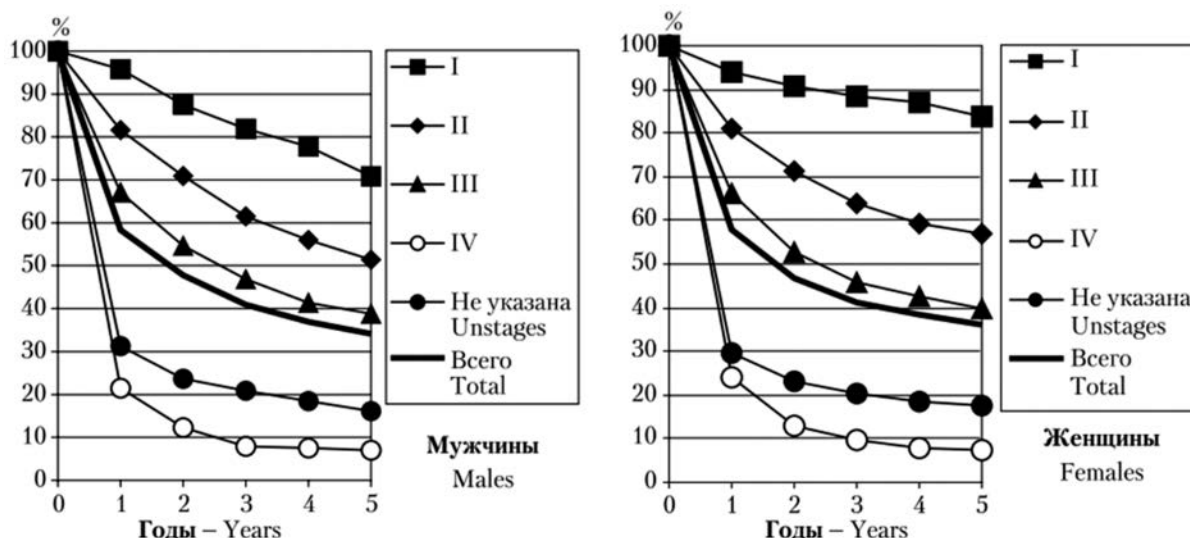


Рисунок 1. Данные популяционного ракового регистра Санкт-Петербурга за 2002–2003 годы: пятилетняя наблюдаемая выживаемость больных КРР с учетом стадии заболевания. Число случаев, включенных в исследование: 2170 — мужчин и 3101 — женщин

Figure 1. Data from the Population-Based Cancer Registry of Saint Petersburg for the years 2002–2003: Five-year observed survival of CRC patients, stratified by disease stage. Number of cases included in analysis: 2170 — men and 3101 — women

с маркерами в составе везикулярной мембраны и перераспределение аптамеров между поверхностью AuNP и ВНВ: чем больше специфических маркеров или везикул присутствует в реакции — тем эффективней «освобождается» поверхность и восстанавливается пероксидазная активность AuNP. После достижения равновесия, в реакционную смесь добавляется субстрат пероксидазы (ТМБ) и происходит цветная реакция. Интенсивность окрашивания раствора отражает количество специфических ВНВ в реакционной смеси.

Таким образом, сочетание диагностического потенциала циркулирующих ВНВ, секретируемых клетками дифференцированной аденокарциномы толстой кишки [11,10], и разработанной технологии AuNP-аптасенсора [18,19] послужило заделом для разработки нового метода диагностики КРП. В рамках представленного исследования мы использовали последовательности ДНК-аптамеров, аффинность которых к клеткам КРП была показана ранее разными научными группами, создали и оптимизировали AuNP-аптасенсор, и оценили его диагностический потенциал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические реагенты: Фосфатно-солевой буфер, ФСБ (хч, АО «Экос-1», Москва, РФ); тетрахлорурат (III) водорода H_2AuCl_4 (хч, ОАО «Аурат», Москва, РФ); цитрат натрия трехзамещенный двухводный $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (хч, ОАО «Реахим»,

Москва, РФ); 3,3',5,5'-тетраметилбензидин ТМБ (ООО «ХЕМА», Москва, РФ).

Пациенты: План исследования был одобрен локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Все участники подписали информированное согласие относительно участия в исследовании. Биологический материал включался в работу после деперсонализации клинических данных.

Образцы плазмы здоровых доноров ($n = 32$) были получены в отделении переливания крови НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Пациенты с КРП ($n = 37$) поступили в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова для проведения курса адъювантной полихимиотерапии, средний возраст пациентов — 59 лет (от 26 лет до 74 года), гистологический вариант опухоли — высоко- (G1) или умеренно- (G2) дифференцированной аденокарциномы, стадия заболевания по системе TNM: T3-T4, N0-N2, M0-M1. Пациенты с болезнью Крона ($n = 7$) проходили лечение в ФГБОУ ВО Ростовский Государственный Медицинский Университет Минздрава России, в каждом случае диагноз был верифицирован в ходе гистологического исследования образца ткани из очага поражения слизистой оболочки толстой кишки.

Оценка «опухолевой нагрузки» пациентов с КРП:

Визуализация очагов опухолевого роста у пациентов с КРП проводилась с помощью компьютерной томографии (КТ), суммарный объем ткани опухоли был определен с помощью инструмента для полуавтоматической трёхмерной сегментации с волюметрией (ПО Philips Intelli Space Portal). На всех срезах серии КТ изображений вручную графически выделялись первичное новообразование и метастазы, после чего автоматически выполнялся расчёт объема «опухолевой нагрузки» в миллилитрах.

Выделение ВНВ из плазмы: Венозная кровь (5 мл) собиралась в вакутейнеры с ЭДТА. Плазма отделялась путем центрифугирования 15 мин. — 1500 × g, замораживалась и хранилась при -80°C . Перед использованием плазму медленно размораживали при $+4^\circ\text{C}$, последовательно центрифугировали при $+4^\circ\text{C}$ 10 мин. — 300 × g, 10 мин. — 800 × g и 10 мин. — 2,200 × g, супернатант переносили в чистую пробирку после каждого центрифугирования. Плазму фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм. Полученная очищенная плазма в дальнейшем использовалась для выделения внеклеточных нановезикул с помощью двухфазной полимерной системы по описанному ранее протоколу [20]. В заключении, ВНВ, выделенные из 5 мл плазмы, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ.

Определение концентрации и размера (гидродинамического диаметра) ВНВ проводили с помощью анализатора траектории наночастиц NanoSight NS300

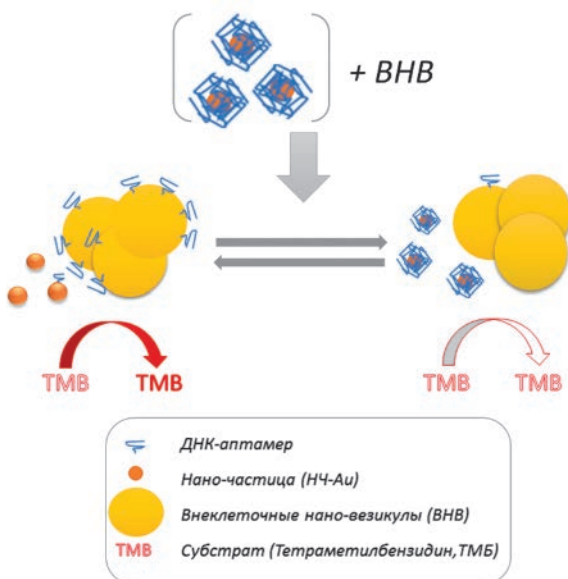


Рисунок 2. Принцип метода AuNP-аптасенсор
Figure 2. Principle of the AuNP-aptasensor method

(Malvern Panalytical, Malvern, США). Анализируемые образцы предварительно были разведены в ФСБ в соотношении 1:200 или 1:1000. Каждый образец пропускать через камеру наблюдения так, чтобы провести 5 измерений на разных микрообъемах одного и того же образца. Каждое измерение длилось 30 с и включало 749 кадров. По результатам пяти измерений проводился расчет средних значений и стандартных отклонений для размера и концентрации ВНВ в суспензии.

Анализ экспрессии поверхностных маркеров ВНВ был проведен методом проточной цитометрии с помощью набора Eхо-FACS (HansaBioMed, Эстония) в соответствии с протоколом производителя. Латексные частицы (ЛЧ) диаметр 4 мкм использовали для неспецифической сорбции ВНВ в ходе 30 мин. инкубации, несвязанные ВНВ удаляли путем центрифугирования. Комплекс ЛЧ-ВНВ инкубировали с антителами (АТ) к маркерным тетраспанинам CD63 (AbCam, США, ab8319FAM-labeled) и CD9 (AbCam, США, ab82394PE-labeled) в концентрации 1 мг/мл в течение 2 ч при +4°C в темноте. Комплексы «ЛЧ-ВНВ-АТ» дважды отмывали в 500 мкл ФСБ и ресуспендировали в 200 мкл ФСБ. Комплексы, полученные без инкубации с ВНВ, использовали в качестве отрицательного контроля. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX.

Синтез золотых наночастиц (AuNP) проводили цитратным методом Туркевича [21] с незначительными изменениями. В двугорлую круглодонную колбу объемом 250 мл, оснащенную водяным холодильником, переносится 98 мл деионизированной воды и 2 мл 50 мМ раствора HAuCl_4 . Реакционную смесь доводили до кипения, затем в реакцию вводили 10 мл 38,8 мМ горячего раствора цитрата натрия. После изменения цвета реакционной смеси на бурый, раствор кипятили 70 минут. Раствор с AuNP далее остужали до комнатной температуры при постоянном перемешивании, центрифугировали в течение 5 мин. — 3000 × g для седиментации крупных конгломератов, взвесь частиц переносили с чистые пробирки и хранили при +4°C.

Анализ золотых наночастиц (AuNP): размер и ζ-потенциал оценивали методом динамического светорассеяния с помощью анализатора Nanotrack Wave II (Microtrac Inc., Montgomeryville, США). Образец AuNP разбавлялся водой в соотношении 1:2. Измерения проводились при следующих настройках: показатель преломления — 1,33, минимальная температура — 20°C, максимальная температура — 30°C, количество измерений — 5, время одного измерения — 30 с. Для определения размера и ζ-потенциала AuNP использовался лазер с длиной волны 780 нм (инфракрасный свет).

ДНК-аптамеры: последовательности аптамеров представлены в таблице 1, синтез и очистка (ВЭЖХ) были проведены АО «ГенТерра» (Москва, РФ), лиофилизаты были растворены в воде, аликвотированы и хранились при –20°C.

Полуколичественная оценка КРР-специфичных ВНВ была проведена с помощью AuNP-аптасенсора. К 10 мкл суспензии AuNP (размер: 10 нм, ζ-потенциал: –23 мВ) добавляли 2 мкг ДНК-аптамера (объем раствора рассчитывали, исходя из молярной концентрации) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. К комплексу AuNP-аптамер добавляли 2 мкл суспензии ВНВ с концентрацией 1×10^{11} – 5×10^{11} частиц/мл, аккуратно перемешивали и инкубировали 30 минут при комнатной температуре и перемешивании 350 rpm. Для оценки ФМА в реакционную смесь вносили 20 мкл ТМБ и инкубировали 15 минут при температуре 37°C и перемешивании 450 rpm. После завершения реакции перекисного окисления ТМБ, реакционную смесь центрифугировали 5 минут — 3000 × g, супернатант переносили в 384-луночный планшет для измерения абсорбции с помощью мультимодального ридера Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 370 нм.

Статистическая обработка и анализ данных

Анализ экспериментальных данных осуществляли с помощью ПО Nanosight NTA 3.4, Mсirotac FLEX 11.1.0.2, SkanIt RE 6.0.2, CytExpert и GraphPad Prism 9. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Оценку степени линейной корреляции 2 независимых параметров проводили с помощью расчета коэффициента корреляции rПирсона.

Финансирование. Исследования проводились в рамках государственного задания «Разработка и клиническая апробация тест-системы для диагностики онкологических заболеваний органов желудочно-кишечного тракта на основе технологии AuNP-аптасенсора», регистрационный номер 1023022000032-9.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внеклеточные нановезикулы (ВНВ) были выделены из плазмы с помощью двухфазной полимерной системы [22], так как этот метод выделения эффективен при работе с малым количеством материала. Концентрация ВНВ, выделенных из 1,5 мл плазмы и ресуспендированных в 100 мкл, определялась в диапазоне $0,7 \times 10^{11}$ – $1,7 \times 10^{12}$ частиц/мл. Размер

(гидродинамический диаметр) ВНВ колебался в диапазоне 63,9–115,5 нм, среднее значение среди доноров и пациентов составило 103 нм. Репрезентативные графики, отображающие характеристики ВНВ доноров и пациентов, представлены на рисунках 3А и 3В, соответственно.

Везикулярные маркеры CD63 и CD9 детектировали с помощью технологии «bead-assisted» проточной цитометрии. На рисунках 3С и 3D представлены репрезентативные результаты анализа ВНВ, выделенных из плазмы донора. Исследование было проведено для выборочных образцов, и получены воспроизводимые результаты, соответствующие литературным данным [23]. По совокупности результатов, представленных на рисунке 3, можно заключить, что ВНВ, выделенные из плазмы для последующего анализа, были представлены гомогенной популяцией CD63- и CD9-позитивных везикул с характерным размером около 103 нм.

Наночастицы золота (AuNP) были синтезированы классическим методом Туркевича, который основан

на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Механизм образования AuNP включает в себя два этапа. На первом этапе трехвалентное золото (Au^{3+}) под действием цитрата восстанавливается до одновалентного золота (Au^+) и одновременно с этим процессом цитрат окисляется до ацетондикарбоксилата. Второй этап подразумевает реакцию диспропорционирования, в которой производится металлическое золото (Au^0), экранированное ионами цитрата и снова трехвалентное золото (Au^{3+}). Общая реакция, отражающая суть механизма, представлена на рисунке 4А.

В среднем, метод Туркевича позволяет получить AuNP размером от 10 до 150 нм в диаметре, размер частиц зависит от количества добавляемого цитрата [24]. При использовании HAuCl_4 и цитрата натрия в соотношении 1:3 ожидалось получить AuNP размером 10–50 нм. Определив размер полученных AuNP методом динамического светорассеяния, было подтверждено, что диаметр золотых наночастиц составил 10–15 нм (Рис. 4В). Поверхностный

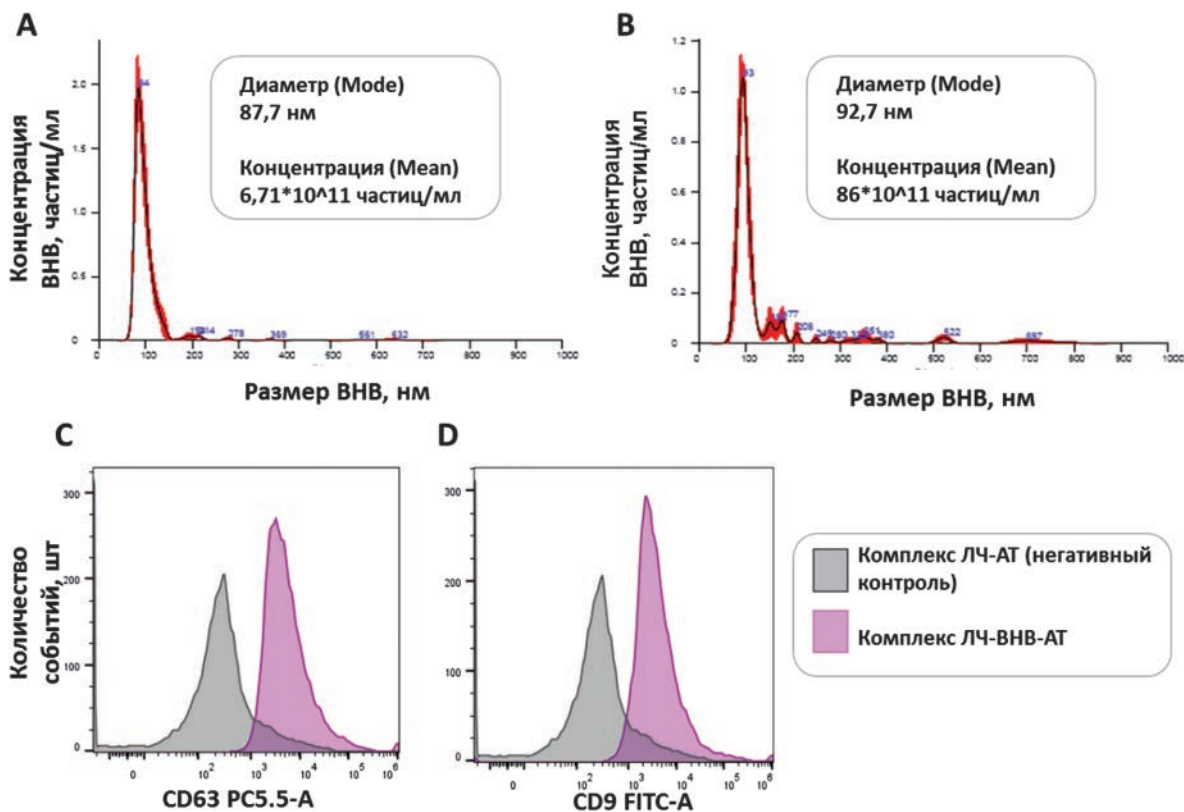


Рисунок 3. Характеристика ВНВ. Репрезентативные примеры результатов оценки размера и концентрации ВНВ, выделенных из плазмы донора (А) и плазмы пациента с КРП (В) с помощью технологии анализа траекторий наночастиц (АТН). Репрезентативный пример результатов анализа экспрессии экзосомальных маркеров CD63 (С) и CD9 (D) на ВНВ, выделенных из плазмы донора, методом проточной цитометрии

Figure 3. Characterization of SEVs. Representative examples of the results of assessing the size and concentration of SEV isolated from donor (A) and CRC patient (B) plasma using nanoparticle trajectory analysis technology (NTA). Representative example of the results of the evaluation of exosomal markers of the SEV CD63 (C) and CD9 (D) on the surface of plasma vesicles by flow cytometry

Таблица 1. Характеристика ДНК-аптамеров
Table 1. Characterization of DNA-aptamers

п/п	Название, ссылка	Последовательность (5' → 3'), длина	Мишень, использованная при отборе в процессе SELEX
1	Seq-2 [33]	TATAGCAATGGTACGGTACTTCTCAACTCGTCCCTACCGAGCCTCTCTG GTCCCTTGCAACTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA (88)	Сыворотка пациентов с колоректальным раком
2	Seq-4 [33]	CTATAGCAATGGTACGGTACTTCTGCTGGTTCGGCATGGCTTGGACTGT CCCTGCGCATTTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA (88)	
3	ApC1 [16]	AGTGAGTGTAGTGCTCGCGGGCACAATTTCTGTTAGTCTTCTTTAATCGGC CATGGAAGGTCTGATGTGGC (71)	Клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека Caco-2
4	KDED19 [15]	AGAGACCTGACTGCGAAGGGTGGTTTTCAAAGACTTTCCTGACTCC TCTGTGGTGGACAGGTGGCTTCTT (75)	Клеточные линии колоректальной аденокарциномы человека DLD-1, HT-29 и колоректальной карциномы человека HCT-116
5	KCHA10a [15]	ACGCAGCAGGGGAGCGAGAGCGACAATAACGATGGTGGGACCCAA CTGTTTGGACA (59)	
6	CCE-10F [26]	GGCCTAAGAAGGACAGGGTGACAATCAGGGGGAGAGGGGCTGGCTCG AACAAGCTTGC (59)	ВНВ, выделенные из клеточной линии колоректальной аденокарциномы человека SW620
7	XL-33-1 [34]	CCCATCAATGTTACGACCCGCTAGGGCTGCTGTGCCATCGGGTAA (45)	Клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека SW620
8	W-3 [27]	AGCAGCGTGGAGGATAGGGTGGAGTGGGTGGTTATGATTGGCTCTTC TGGCTGC (57)	Клеточные линии колоректальной аденокарциномы человека LoVo и HCT-8
9	W-14 [27]	AGGATACAGGTTGGCTTTGGTGGCTATGGGTTGGGTGGTGGCTATC CT (50)	

электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) AuNP составил — 26,1 мВ. Отрицательный ζ -потенциал обусловлен тем, что поверхность наночастиц экранирована отрицательно заряженными ионами лимонной кислоты [25]. Коэффициент полидисперсности для коллоидного раствора AuNP составил 0,33. Это значение отражало допустимый диапазон распределения наночастиц по размеру. AuNP различного размера способны поглощать электромагнитные волны разной длины в видимом диапазоне. Так, для золотых наночастиц диаметром 5–30 нм характерно поглощение света в зеленом спектре с диапазоном длин волн 515–526 нм [25]. Спектр поглощения, синтезированных AuNP, с пиком на 521 нм (Рис. 4С) соответствовал ожиданиям.

В целом, характеристики полученных наночастиц (размер, ζ -потенциал, гомогенность) соответствовали критериям, необходимым для формирования AuNP-аптамасенсора [19].

Выбор потенциальных аптамеров

Поиск ДНК-аптамеров, потенциально аффинных к ВНВ, секретлируемым клетками дифференцированной аденокарциномы толстой кишки, был основан на анализе литературных данных. Были выбраны исследования, авторы которых использовали технологию SELEX. При этом в выбранных исследованиях были использованы различные мишени для аффинной селекции аптамеров (различные линии клеток КРП, везикулы, выделенные из культуральной среды или плазмы пациентов с КРП) и различные

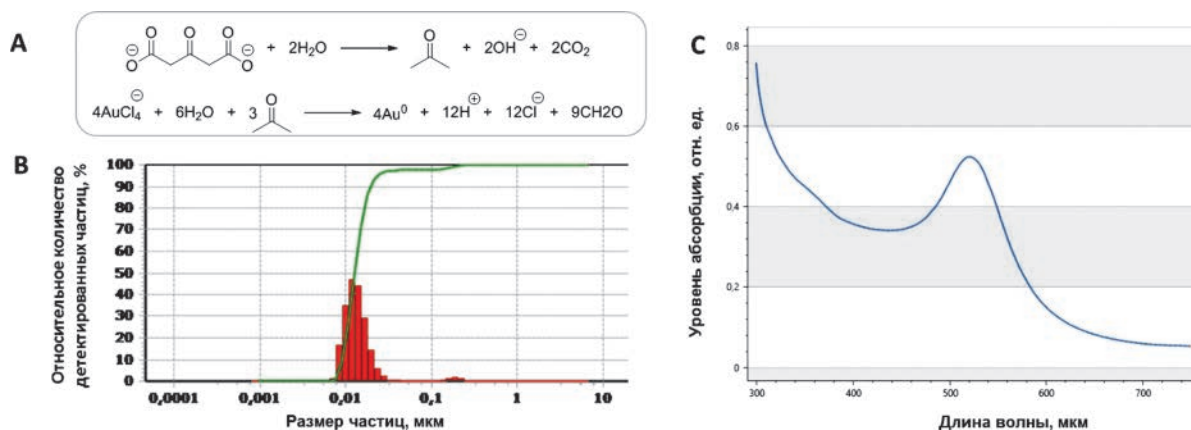


Рисунок 4. Характеристика золотых НЧ, синтезированных по методу Туркевича. Общая схема синтеза AuNP (А). График распределения размера AuNP (В). Спектр поглощения наночастиц золота (С)

Figure 4. Characteristics of gold NPs synthesized by the Turkevich method. General scheme of AuNP synthesis (A). AuNP size distribution plot (B). Absorption spectrum of gold nanoparticles (C)

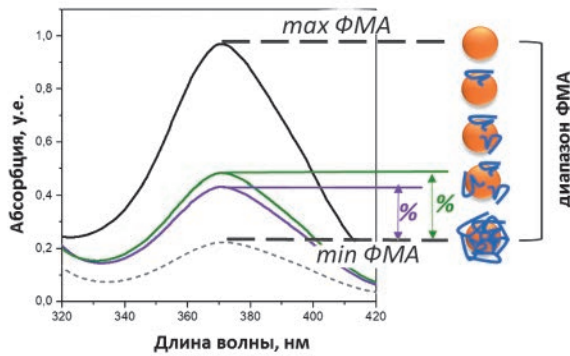


Рисунок 5. Принцип интерпретации результатов AuNP-аптасенсинга

Figure 5. Principles of AuNP-aptasensing results interpretation

модификации технологии SELEX [15,16,26–36]. В таблице 1 представлена информация о выбранных для работы аптамерах, включая оригинальное (авторское) название, последовательность, длину и материал, использованный в ходе селекции (SELEX).

Представленные в таблице 1 аптамеры были синтезированы и использованы в последующих исследованиях.

Оптимизация и тестирование AuNP-аптасенсоров с индивидуальными аптамерами

Несмотря на общий принцип работы AuNP-аптасенсора, длина и нуклеотидная последовательность ДНК-аптамеров оказывает влияние на динамику их взаимодействия с AuNP. В частности, эффективность неспецифического взаимодействия с поверхностью AuNP и угнетения ФМА определялась абсолютной концентрацией ДНК, а эффективность специфического взаимодействия с везикулярными маркерами — количеством молекул или молярной концентрацией ДНК-аптамеров. Поэтому эффективное использование каждого аптамера требовало оптимизации технологии AuNP-аптасенсинга и разработки метода нормализации получаемых результатов. Так, в отсутствие в реакционной смеси ДНК-аптамеров AuNP проявляли определенный (стабильный) уровень ФМА, который был принят за максимальный — maxФМА. Для каждого аптамера была определена минимальная концентрация, которая обеспечивала полное угнетение ФМА AuNP. Разница между максимальной ФМА (maxФМА) свободных AuNP и минимальной ФМА (minФМА) AuNP, заблокированных ДНК-аптамерами, принималась за диапазон

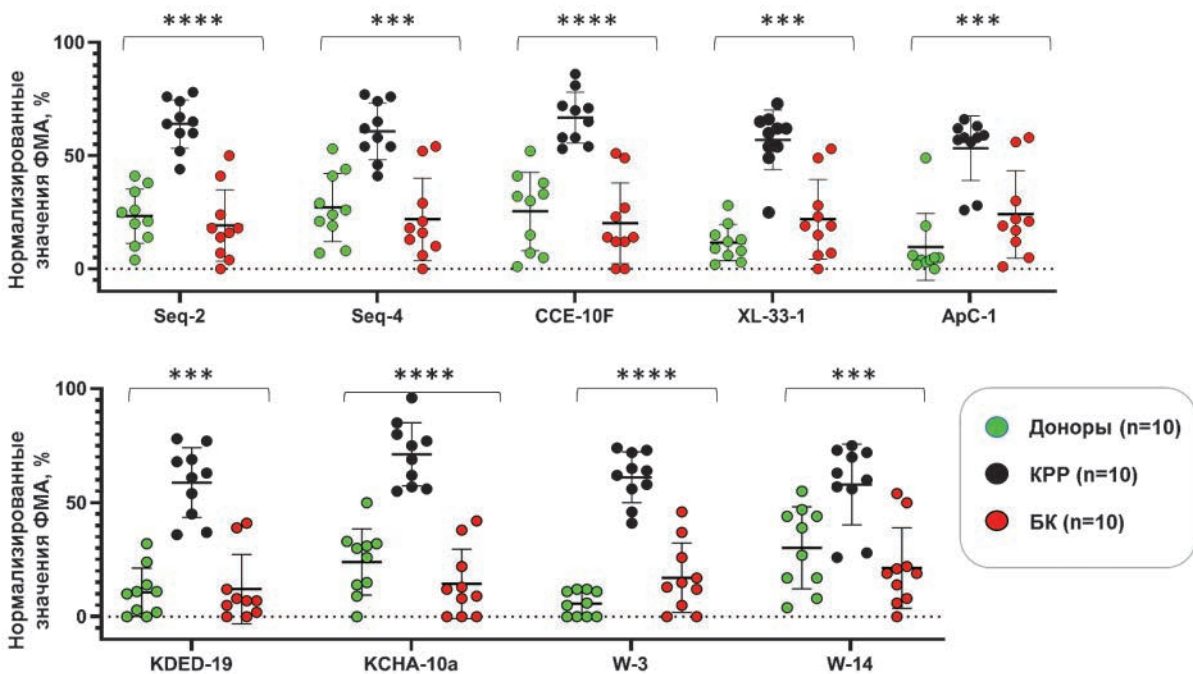


Рисунок 6. Анализ ВВВ из плазмы с помощью AuNP-аптасенсоров с девятью разными ДНК-аптамерами. Сравнение проведено между пациентами с КРП и группами контроля (здоровых доноров и пациентов с болезнью Крона). Интенсивность абсорбции измеряли на длине волны 370 нм. Статистическую значимость разницы, наблюдаемой между тремя группами, вычисляли с использованием непараметрического критерия *H*-Крускала–Уоллиса; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$

Figure 6. Analysis of plasma SEVs using AuNP-aptasensors with nine different DNA-aptamers. Comparison was made between patients with CRC and control groups (healthy donors and patients with Crohn's disease). Absorption intensity was measured at a wavelength of 370 nm. Statistical significance of the difference observed between three groups was estimated by the nonparametric *H*-Kruskal–Wallis; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.00005$

ФМА (Рис. 5). Этот показатель несколько отличался для AuNP-аптасенсоров на основе разных аптамеров. В каждом случае, степень восстановления ФМА AuNP после инкубации с ВНВ выражали как % диапазона ФМА, установленного для соответствующего аптамера. Такой подход позволял сравнивать результаты анализа разных образцов ВНВ одним AuNP-аптасенсором (Рис. 5) и сопоставлять результаты, полученные для одного образца ВНВ с помощью разных аптамеров.

AuNP-аптасенсоров, работающих на основе девяти разных аптамеров, были подготовлены для сравнительного анализа трех групп образцов ВНВ, полученных из плазмы пациентов с КРП ($n = 10$), пациентов с болезнью Крона ($n = 10$) и здоровых доноров ($n = 10$). Группа пациентов с болезнью Крона (БК) была включена в исследование с целью оценки клинической чувствительности разработанной технологии. Морфологическим субстратом БК являются участки гранулематозного воспаления, разрастания железистого эпителия не наблюдается, поэтому нет причин для появления в плазме ВНВ с характерными маркерами. Результаты анализа, выраженные в процентах от диапазона ФМА чувствительности, соответствующих AuNP-аптасенсоров, представлены на рисунке 4. В случае всех девяти аптамеров были обнаружены статистически значимые различия между исследуемыми группами, в ряде случаев (KDED-19, КСНА-10а, W3) диапазоны значений, полученных для здоровых доноров и пациентов с КРП, даже не «пересекались». Важным наблюдением была очевидная разница между результатами, полученными для пациентов с КРП и болезнью Крона, что подтвердило клиническую специфичность метода.

Оптимизация и тестирование AuNP-аптасенсора на основе смеси девяти аптамеров

С учетом результатов, полученных в ранее проведенных исследованиях, мы предположили, что использование комбинации из всех девяти ДНК-аптамеров может повысить диагностический потенциал технологии. С учетом того факта, что молекулярные мишени использованных в исследовании ДНК-аптамеров неизвестны, применение всех девяти сенсоров эмпирически должно повышать эффективность анализа.

Для оценки этой гипотезы была приготовлена эквимольная смесь из девяти аптамеров, проведена соответствующая оптимизация AuNP-аптасенсора-9 и анализ двух групп ранее использованных образцов: здоровых доноров ($n = 10$) и пациентов с КРП ($n = 10$). Результаты представлены на рисунке 7.

При использовании комбинации аптамеров, обнаруженные различия между двумя группами, как и в случае индивидуальных ДНК-аптамеров оказались

на высоком уровне статистической значимости. Этот подход позволил четко разделить две группы образцов, но для оценки целесообразности применения AuNP-аптасенсора-9 необходимо исследование большего количества образцов. Возможным аргументом в пользу использования AuNP-аптасенсора-9 может оказаться его экономичность: одна реакция с использованием смеси аптамеров дешевле девяти (в данном случае) реакций с отдельными аптамерами.

Анализ расширенной выборки образцов с помощью AuNP-аптасенсора-9

Для получения более достоверных результатов исследуемая выборка была увеличена до 32 образцов доноров и 37 образцов пациентов (Рис. 8). Как и ожидалось, на большей выборке образцов уровень диагностической значимости между двумя группами повысился (AUC — 0,95, специфичность — 88,89%, чувствительность — 90,63%). При этом часть образцов оказалась в «серой зоне», что указывает на естественный относительный характер полученных результатов — рост концентрации специфических ВНВ не является качественным признаком, а представляет

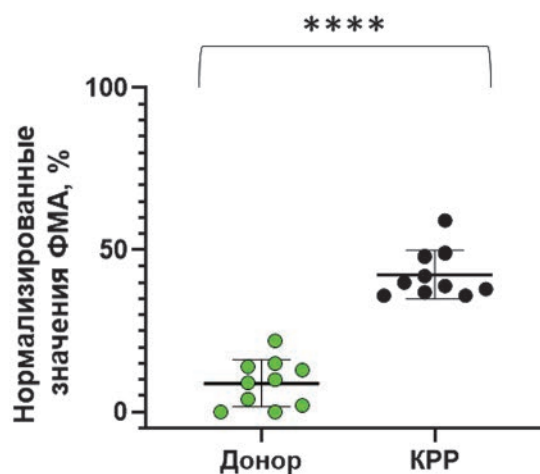


Рисунок 7. Анализ ВНВ плазмы с помощью AuNP-аптасенсора-9 на основе комбинации девяти ДНК-аптамеров. Сравнение проведено между пациентами с КРП и группой здоровых доноров. Интенсивность абсорбции измеряли на длине волны 370 нм. Статистическую значимость разницы, наблюдаемой между двумя группами, вычисляли с использованием непараметрического критерия U-Манна-Уитни; **** $p < 0,00005$

Figure 7. Analysis of plasma SEV using AuNP-aptasensor-9 with a combination of nine DNA-aptamers. Comparison was made between patients with CRC and a control group of healthy donors. Absorption intensity was measured at a wavelength of 370 nm. Statistical significance of the difference observed between two groups was estimated by nonparametric U-Mann-Whitney test; **** $p < 0.00005$

собой динамический показатель количества и метаболической активности железистого эпителия толстой кишки. Полученные результаты указывают на необходимость оптимизации технологии и важность разработки алгоритмов использования этой технологии в клинической практике.

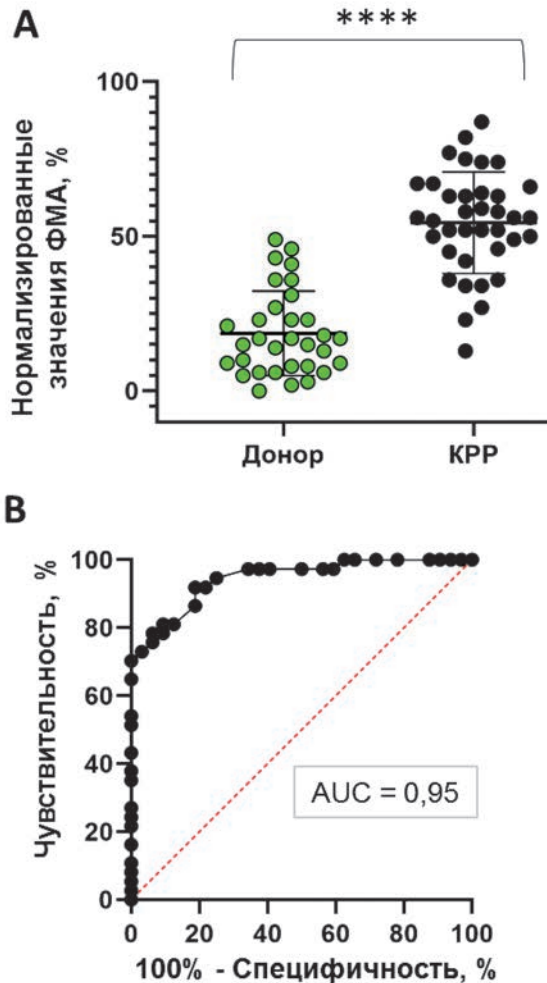


Рисунок 8. Анализ ВНВ из плазмы с помощью AuNP-аптасенсора-9 с комбинацией из девяти ДНК-аптамеров. Сравнение проведено между пациентами с КРП ($n = 37$) и группой контроля (здоровых доноров, $n = 32$). (А) Интенсивность абсорбции измеряли на длине волны 370 нм. Статистическую значимость разницы, наблюдаемой между двумя группами, вычисляли с использованием непараметрического критерия U-Манна-Уитни; **** $p < 0,00005$. (В) ROC-анализ для смеси ДНК-аптамеров ($AUC = 0,95$)

Figure 8. Analysis of plasma SEV using AuNP-aptasensor-9 with a combination of nine different DNA-aptamers. Comparison was made between patients with CRC ($n = 37$) and a control group (healthy donors, $n = 32$). (A) Absorption intensity was measured at a wavelength of 370 nm. Statistical significance of the difference observed between two groups was estimated by non-parametric U-Mann-Whitney test; **** $p < 0.00005$. (B) ROC analysis for DNA-aptamer mixture ($AUC = 0.95$)

Оценка корреляции между объемом опухоли и результатами AuNP-аптасенсинга

В ранее проведенных исследованиях мы наблюдали корреляцию между результатами полуколичественного анализа CD30(+) ВНВ у пациентов с лимфомой Ходжкина и данными ПЭТКТ, интегрально отражающими объем и метаболическую активность опухоли [19]. Аналогично была исследована связь между результатами анализа ВНВ с помощью AuNP-аптасенсора (или количеством специфичных ВНВ в плазме) и размером опухоли у пациентов с КРП до начала химиотерапии. Суммарный размер первичной опухоли и метастазов был визуально определен на основе данных КТ и выражен в мл (или см^3). Результаты представлены на рисунке 9.

У трети пациентов (34%) наблюдалась корреляция между исследуемыми параметрами: значения, расположенные в области доверительного 95% интервала выделены черным на рисунке 9. Однако в остальных случаях, очевидной связи между объемом опухолевой ткани и показателями AuNP-аптасенсора обнаружено не было. Полученные результаты указали на очевидный факт: количество КРП-специфичных ВНВ в плазме определяется не только размером опухоли. Как было отмечено выше, результат AuNP-аптасенсора — это динамический показатель, отражающий объем опухолевой ткани (трансформированного кишечного эпителия), степень ее дифференцировки, метаболической активности, васкуляризации и вариабельность экспрессии маркеров, взаимодействующих с аптамерами. Полученные результаты не исключают возможность использования разработанной технологии для динамического наблюдения за пациентами

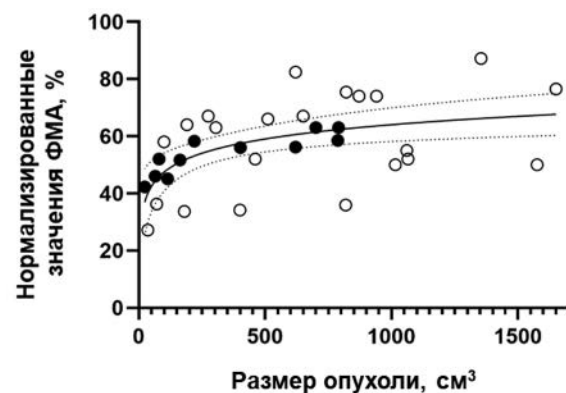


Рисунок 9. Корреляция размера опухоли и результатами AuNP-аптасенсинга (нормализованным значением ФМА, %) у пациентов с КРП ($n = 37$) до начала полихимиотерапии

Figure 9. The relationship between tumor size and AuNP-aptasensing results (expressed as normalized enzyme-mimetic activity, %) was investigated in colorectal cancer patients ($n = 37$) before the initiation of polychemotherapy

с КРР и/или оценки эффекта проводимой терапии, но обоснование такого применения требует проведения соответствующих исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные результаты демонстрируют диагностический потенциал ВНВ при использовании технологии AuNP-аптасенсор: данные, полученные при анализе девяти разных аптамеров, а также их смеси, показали статистически значимую разницу между группой пациентов с КРР, здоровых доноров и пациентов с болезнью Крона. Слабая корреляция между размером опухоли и относительным количеством ВНВ в плазме пациентов с КРР имеет объяснимые причины и указывает направления дальнейшего развития технологии.

Анализ научной литературы показывает активность поисковых исследований, направленных на реализацию диагностического потенциала ВНВ плазмы в контексте КРР. Комплексный биохимический состав ВНВ является основным фактором, определяющим широкий спектр и перспективы таких исследований. Так, в состав ВНВ входят липиды и полисахариды мембраны, мембранные и цитоплазматические белки, нуклеиновые кислоты, включая кодирующие и регуляторные РНК. Анализ различных компонентов предполагает использование различных аналитических технологий. Например, большинство разработок в области диагностики КРР на основе ВНВ основаны на детекции нуклеиновых кислот, в частности, микроРНК методом ОТ-ПЦР. Однако этот метод является недостаточно чувствительным, возможно, из-за сложности выделения микроРНК из ВНВ [37,38]. Менее распространенным направлением является детекция везикулярных белков с помощью антител или аптамеров с использованием различных технологий детекции на основе, например, флуоресценции [39] или электрохимии [40]. Активность исследовательской работы косвенно подтверждается регистрацией нескольких клинических испытаний (NCT03432806, NCT04394572, NCT04523389), завершение которых поможет оценить перспективы повышения эффективности диагностики КРР и снижения смертности от этого заболевания [41–43].

На основе представленных результатов можно сделать следующие выводы:

- технология AuNP-аптасенсинга может служить основой для разработки инновационных методов диагностики КРР и/или мониторинга эффекта системной терапии пациентов с КРР;
- технология AuNP-аптасенсинга реализуема в условиях обычной лаборатории;

– она более экономична, чем другие технологии, применимые в контексте «жидкостной биопсии» (ПЦР, проточная цитометрия или иммуноферментный анализ), т.к. не предполагает использование дорогостоящих белковых компонентов (ферментов, антител); показатели диагностической значимости технологии AuNP-аптасенсинга (AUC — 0,95, специфичность — 88,89%, чувствительность — 90,63%) могут быть повышены путем выбора и использования ДНК-аптамеров с оптимальными характеристиками аффинности.

Условным недостатком проведенного исследования было использование ДНК-аптамеров, ранее разработанных разными группами, и отсутствие информации о молекулярных мишенях, с которыми эти аптамеры взаимодействуют. Этот факт определяет зависимость полученных результатов от дизайна и качества проведения исследований, результаты которых мы использовали. Представляется, что разработка эффективного AuNP-аптасенсора должна быть основана на самостоятельном выборе ДНК-аптамеров с оптимальными характеристиками и известными молекулярными мишенями. Представленное пилотное исследование является заделом для этой работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полуколичественный анализ КРР-специфичных ВНВ плазмы с помощью AuNP-аптасенсора является перспективным методом диагностики КРР. Разработка и внедрение в практику инновационного диагностического метода требует дальнейшей оптимизации технологии, оценки ее диагностического потенциала в рамках более масштабного исследования и разработки алгоритмов интерпретации и клинического применения.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования: *Шаронова Т.В., Малек А.В.*

Сбор биологического материала и клинических данных от пациентов с КРР: *Коваленко И.М., Служев М.А., Семглазова Т.Ю.*

Сбор биологического материала и клинических данных от пациентов с болезнью Крона: *Бурцев Д.В., Димитриади Т.А., Мазовка К.Е., Мкртчян Л.С.*

Сбор и анализ данных рентгенологических исследований: *Васильев А.В., Бурувик И.А.*

Выделение и анализ ВНВ: *Каданцева Е.Я., Кацуба К.Е., Служев М.А., Шаронова Т.В.*

Синтез нано-частиц золота: *Каданцева Е.Я., Кацуба К.Е.*

Статистическая обработка: *Каданцева Е.Я., Кацуба К.Е., Шаронова Т.В.*

Написание текста: *Шаронова Т.В., Малек А.В.*

AUTHORS CONTRIBUTION

Study concept and design: *Tatiana V. Sharonova, Anastasia V. Malek*

Collection of biological material and clinical data from patients with CRC: *Irina M. Kovalenko, Maksim I. Sluzhev, Tatiana Yu. Semiglazova*

Collection of biological material and clinical data from patients with Crohn's disease: *Dmitriy V. Burtcev, Tatiana A. Dimitriadi, Karina E. Mazovka, Lilit S. Mkrtchian*

Collection and analysis of X-ray data: *Aleksandr V. Vasilev, Iliya A. Burovik*

Isolation and analysis of SEV: *Ekaterina Ya. Kadantseva, Konstantin E. Katsuba, Maksim I. Sluzhev, Tatiana V. Sharonova*

Synthesis of gold nanoparticles: *Ekaterina Ya. Kadantseva, Konstantin E. Katsuba*

Statistical processing: *Ekaterina Ya. Kadantseva, Konstantin E. Katsuba, Tatiana V. Sharonova*

Writing of the text: *Tatiana V. Sharonova, Anastasia V. Malek*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ (ORCID)

Шаронова Татьяна Валерьевна — кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России; ORCID 0000-0002-5372-1253

Каданцева Екатерина Я. — лаборант-исследователь лаборатории субклеточных технологий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России; ORCID 0009-0002-7238-5870

Кацуба Константин Евгеньевич — лаборант-исследователь лаборатории субклеточных технологий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России; ORCID 0000-0002-7373-5206

Коваленко Ирина Михайловна — к.м.н., научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России; ORCID 0000-0002-0891-7687

Служев Максим Иванович — врач-онколог НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России; ORCID 0000-0002-6346-1029

Семиглазова Татьяна Юрьевна — д.м.н., профессор, заведующая научным отделом инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России; ORCID 0000-0001-4305-6691

Бурцев Дмитрий Владимирович — д.м.н., президент Диагностической Медицинской Ассоциации «ДиаМА», главный внештатный специалист по КДЛ МЗ РО, главный врач ГАУ Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр», заведующий кафедрой персонализированной и трансляционной медицины РостГМУ Минздрава России; ORCID 0000-0002-4673-7003

Димитриади Татьяна Александровна — д.м.н., руководитель областного центра патологии шейки матки ГАУ Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр»; ORCID 0000-0002-5399-6636

Мазовка Карина Евгеньевна — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней РостГМУ Минздрава России; ORCID 0000-0002-0436-6208

Мкртчян Лилит Срапионовна — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней РостГМУ Минздрава России; ORCID 0000-0002-1820-4488

Васильев Александр Викторович — врач-рентгенолог ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; ORCID 0000-0002-8692-1489

Буровик Илья Александрович — к.м.н., заведующий отделением лучевой диагностики, научный сотрудник отделения диагностической и интервенционной радиологии, врач-рентгенолог ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; ORCID 0000-0002-4714-1228

Малек Анастасия Валерьевна — д.м.н., заведующая лабораторией субклеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; ORCID 0000-0001-5334-7292

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS (ORCID)

Tatiana V. Sharonova — 0000-0002-5372-1253

Ekaterina Ya. Kadantseva — 0009-0002-7238-5870

Konstantin E. Katsuba — 0000-0002-7373-5206

Irina M. Kovalenko — 0000-0002-0891-7687

Maksim I. Sluzhev — 0000-0002-6346-1029

Tatiana Yu. Semiglazova — 0000-0001-4305-6691

Dmitriy V. Burtcev — 0000-0002-4673-7003

Tatiana A. Dimitriadi — 0000-0002-5399-6636

Karina E. Mazovka — 0000-0002-0436-6208

Lilit S. Mkrtchian — 0000-0002-1820-4488

Aleksandr V. Vasilev — 0000-0002-8692-1489

Iliya A. Burovik — 0000-0002-4714-1228

Anastasia V. Malek — 0000-0001-5334-7292

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Мерабишвили М.В. Выживаемость онкологических больных. Санкт-Петербург. 2011; I:Выпуск 2. / Merabishvili M.V. Survival of cancer patients. Saint Petersburg. 2011; I:Issue 2. (In Russ.).

2. Zhang Y, Wang Y, Zhang B, et al. Methods and biomarkers for early detection, prediction, and diagnosis of colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie.*

- 2023;163:114786. doi: [10.1016/j.biopha.2023.114786](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114786)
3. Hanna M, Dey N, Grady WM. Emerging Tests for Noninvasive Colorectal Cancer Screening. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2023;21(3):604–616. doi: [10.1016/j.cgh.2022.12.008](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2022.12.008)
4. Mannucci A, Goel A. Stool and blood biomarkers for colorectal cancer management: an update on screening and disease monitoring. *Molecular Cancer*. 2024;23(1):259. doi: [10.1186/s12943-024-02174-w](https://doi.org/10.1186/s12943-024-02174-w)
5. Ахмалтдинова Л.Л., Авдиенко О.В., Сирота В.Б., и соавт. Биомаркеры в диагностике колоректального рака. *Медицина и экология*. 2018. / Akhmaltdinova L.L., Avdienko O.V., Sirota V.B., et al. Biomarkers in the diagnosis of colorectal cancer. *Medicine and Ecology*. 2018. (In Russ.)
6. Косарева П.В., Конев Р.А., Сивакова Л.В., и соавт. Онкомаркеры в диагностике, прогнозе и выборе метода лечения колоректального рака. *Современные проблемы науки и образования*. 2022. / Kosareva P.V., Konev R.A., Sivakova L.V., et al. Tumor markers in diagnosis, prognosis and choice of treatment method of colorectal cancer. *Modern Problems of Science and Education*. 2022. (In Russ.)
7. Ханевич М.Д., Хазов А.В., Хрыков Г.Н., и соавт. Факторы риска и профилактика колоректального рака. *Профилактическая медицина*. 2019;22(3):107–111. / Khanevich M.D., Khazov A.V., Khrykov G.N., et al. Risk factors and prevention of colorectal cancer. *Preventive medicine*. 2019;22(3):107–111. (In Russ.)
8. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шохзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). Москва, 2024. / Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shokhzadova A.O. Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality). Moscow, 2024. (In Russ.)
9. Gao Y, Qin Y, Wan C, et al. Small Extracellular Vesicles: A Novel Avenue for Cancer Management. *Frontiers in Oncology*. 2021.
10. Nazarova I, Slyusarenko M, Sidina E, et al. Evaluation of Colon-Specific Plasma Nanovesicles as New Markers of Colorectal Cancer. *Cancers*. 2021;13(15):3905. doi: [10.3390/cancers13153905](https://doi.org/10.3390/cancers13153905)
11. Назарова И.В., Никифорова Н.С., Сидина Е.И., и соавт. Возможности диагностики колоректального рака с помощью детекции ткане-специфичных внеклеточных нано-вазикаул. *Колопроктология*. 2019;19(4):32–56. doi: [10.33878/2073-7556-2020-19-4-32-56](https://doi.org/10.33878/2073-7556-2020-19-4-32-56) / Nazarova I.V., Nikiforova N.S., Sidina E.I., et al. Colorectal Cancer Diagnostics Via Detection of Tissue-Specific Extracellular Nano-Vesicles. *Koloproktologia*. 2019;19(4):32–56. (In Russ.). doi: [10.33878/2073-7556-2020-19-4-32-56](https://doi.org/10.33878/2073-7556-2020-19-4-32-56)
12. Röthlisberger P, Hollenstein M. Aptamer chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;134:3–21. doi: [10.1016/j.addr.2018.04.007](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.007)
13. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818–822. doi: [10.1038/346818a0](https://doi.org/10.1038/346818a0)
14. Li W-M, Bing T, Wei J-Y, et al. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells. *Biomaterials*. 2014;35(25):6998–7007. doi: [10.1016/j.biomaterials.2014.04.112](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.112)
15. Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, et al. DNA Aptamers as Molecular Probes for Colorectal Cancer Study. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e14269. doi: [10.1371/journal.pone.0014269](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014269)
16. Maimaitiyiming Y, Yang C, Wang Y, et al. Selection and characterization of novel DNA aptamer against colorectal carcinoma Caco-2 cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2019;66(3):412–418. doi: [10.1002/bab.1737](https://doi.org/10.1002/bab.1737)
17. Zhu C, Li L, Wang Z, et al. Recent advances of aptasensors for exosomes detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020;160:112213. doi: [10.1016/j.bios.2020.112213](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112213)
18. Касуба К.Е., Крамынин Л.А., Слюсаренко М.А., и соавт. Диагностический потенциал CD30(+)-нановезикул плазмы при лимфоме Ходжкина. *Онкогематология*. 2023;18(4):145–155. doi: [10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155](https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155) / Katsuba KE, Kramynin LA, Slyusarenko MA, et al. Diagnostic potential of CD30(+)-plasma nanovesicles in Hodgkin's lymphoma. *Oncohematology*. 2023;18(4):145–155. (In Russ.). doi: [10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155](https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155)
19. Slyusarenko M, Shalaev S, Valitova A, et al. AuNP Aptasensor for Hodgkin Lymphoma Monitoring. *Biosensors*. 2022. doi: [10.3390/bios12010023](https://doi.org/10.3390/bios12010023)
20. 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):1–15. doi: [10.3390/life13040885](https://doi.org/10.3390/life13040885)
21. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;55(03):580–584. doi: [10.1039/d9511100055](https://doi.org/10.1039/d9511100055)
22. 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. doi: [10.3390/polym13030458](https://doi.org/10.3390/polym13030458)
23. Willms E, Cabañas C, Mäger I, et al. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Frontiers in Immunology*. 2018. doi: [10.3389/fimmu.2018.00738](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00738)
24. Yahaya ML, Zakaria ND, Noordin R, et al. Synthesis of large and stable colloidal gold nanoparticles (AuNPs) by seeding-growth method. *Materials Today: Proceedings*. 2022;66:2943–2947. doi: [10.1016/j.matpr.2022.06.563](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.06.563)
25. Shah J, Purohit R, Singh R, et al. ATP-enhanced peroxidase-like activity of gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;456:100–107. doi: [10.1016/j.jcis.2015.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.06.015)
26. Cha BS, Jang YJ, Lee ES, et al. Development of a Novel DNA Aptamer Targeting Colorectal Cancer Cell-Derived Small Extracellular Vesicles as a Potential Diagnostic and Therapeutic Agent. *Advanced Healthcare Materials*. 2023;12(27):1–14. doi: [10.1002/adhm.202300854](https://doi.org/10.1002/adhm.202300854)
27. Li WM, Bing T, Wei JY, et al. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells. *Biomaterials*. 2014;35(25):6998–7007. doi: [10.1016/j.biomaterials.2014.04.112](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.112)
28. Zheng Y, Zhao Y, Di Y, et al. DNA aptamers from whole-serum SELEX as new diagnostic agents against gastric cancer. *RSC Advances*. 2019. doi: [10.1039/C8RA08642G](https://doi.org/10.1039/C8RA08642G)
29. Wu X, Zhao Z, Bai H, et al. DNA Aptamer Selected against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma for in vivo Imaging and Clinical Tissue Recognition. *Theranostics*. 2015;5(9):985–994. doi: [10.7150/thno.11938](https://doi.org/10.7150/thno.11938)
30. Wu X, Liu H, Han D, et al. Elucidation and structural modeling of cd71 as a molecular target for cell-specific aptamer binding. *Journal of the American Chemical Society*. 2019;141(27):10760–10769. doi: [10.1021/jacs.9b03720](https://doi.org/10.1021/jacs.9b03720)
31. Champanhac C, Teng IT, Cansiz S, et al. Development of a panel of DNA Aptamers with High Affinity for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Scientific Reports*. 2015;5:1–8. doi: [10.1038/srep16788](https://doi.org/10.1038/srep16788)
32. Clawson GA, Abraham T, Pan W, et al. A Cholecystokinin B Receptor-Specific DNA Aptamer for Targeting Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2017;27(1):23–35. doi: [10.1089/nat.2016.0621](https://doi.org/10.1089/nat.2016.0621)
33. Li K, Qi L, Gao L, et al. Selection and preliminary application of a single stranded DNA aptamer targeting colorectal cancer serum. *RSC Advances*. 2019;9(66):38867–38876. doi: [10.1039/c9ra04777h](https://doi.org/10.1039/c9ra04777h)
34. Li X, An Y, Jin J, et al. Evolution of DNA aptamers through in vitro metastatic-cell-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for metastatic cancer recognition and imaging. *Analytical Chemistry*. 2015;87(9):4941–4948. doi: [10.1021/acs.analchem.5b00637](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00637)
35. Cao HY, Yuan AH, Chen W, et al. A DNA aptamer with high affinity and specificity for molecular recognition and targeting therapy

- of gastric cancer. *BMC Cancer*. 2014. doi: [10.1186/1471-2407-14-699](https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-699)
36. Huang X, Zhong J, Ren J, et al. A DNA aptamer recognizing MMP14 for in vivo and in vitro imaging identified by cell-SELEX. *Oncology Letters*. 2019;18(1):265–274. doi: [10.3892/ol.2019.10282](https://doi.org/10.3892/ol.2019.10282)
37. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2015;113(2):275–281. doi: [10.1038/bjc.2015.201](https://doi.org/10.1038/bjc.2015.201)
38. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS one*. 2014;9(4):e92921. doi: [10.1371/journal.pone.0092921](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092921)
39. Wei P, Wu F, Kang B, et al. Plasma extracellular vesicles detected by Single Molecule array technology as a liquid biopsy for colorectal cancer. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020. doi: [10.1080/20013078.2020.1809765](https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1809765)
40. Park J, Park JS, Huang C-H, et al. An integrated magneto-electrochemical device for the rapid profiling of tumour extracellular vesicles from blood plasma. *Nature biomedical engineering*. 2021;5(7):678–689. doi: [10.1038/s41551-021-00752-7](https://doi.org/10.1038/s41551-021-00752-7)
41. A Study of Imaging, Blood, and Tissue Samples to Guide Treatment of Colon Cancer and Related Liver Tumors. DOI: NCT03432806
42. Identification of New Diagnostic Protein Markers for Colorectal Cancer (EXOSCOL01). DOI: NCT04394572
43. Contents of Circulating Extracellular Vesicles: Biomarkers in Colorectal Cancer Patients (ExoColon). DOI: NCT04523389