

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И
МИКРООРГАНИЗМОВ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

АВДЕЕВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**ДОСТАВКА БИОМОЛЕКУЛ В КЛЕТКИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЛОЕВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА
И ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

03.01.02 – биофизика

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Т.Е. Пылаев

Саратов – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Основные термины и понятия, история развития технологий клеточной инженерии.....	12
1.2 Агенты для внутриклеточной доставки на основе НК.....	15
1.3 Системы внутриклеточной доставки: принципы действия, проблемы и перспективы.....	18
1.3.1 Редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9.....	20
1.3.2 Биологические системы.....	21
1.3.3 Химические системы.....	23
1.3.3.1 Системы доставки на основе наноматериалов.....	26
1.3.4 Системы доставки на основе физических воздействий.....	29
1.3.4.1 Лазерная трансфекция клеток.....	30
1.4 Пути и механизмы проникновения экстраклеточных НК через естественные клеточные и тканевые барьеры.....	38
1.5 Постановка задач исследования.....	42
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Реактивы.....	43
2.2 Материалы.....	44
2.3 Оборудование.....	46
2.4 Методы.....	48
2.4.1 Синтез, функционализация и характеристика НЧЗ.....	49
2.4.2 Приготовление и характеристика слоев НЧЗ.....	52
2.4.3 Нарботка препаратов плазмидной ДНК методом молекулярного клонирования.....	53
2.4.4 Культивирование клеток и подготовка к оптопорации.....	54
2.4.5 Оптопорация клеток на слоях НЧЗ.....	54
2.4.6 Оценка эффективности оптопорации клеток.....	56

2.4.7 Оценка жизнеспособности клеток.....	57
2.4.8 Опототрансфекция клеток HeLa для получения клонов со стабильной экспрессией флуоресцирующих белков.....	58
2.4.9 Изучение механических свойств оптопорированных клеток HeLa методом АСМ.....	60
2.4.10 Статистическая обработка экспериментальных данных	61
Глава 3. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОСЛОЕВ НАНОЧАСТИЦ	62
3.1 Характеристика наночастиц.....	62
3.2 Получение слоев НЧЗ	64
3.3 Характеристика слоев НЧЗ	66
3.3.1 Равномерность покрытия.....	66
3.3.2 Величина адсорбции	67
3.3.3 Плотность упаковки частиц в слое.....	68
3.4 Оценка параметров биосовместимости слоев НЧЗ и лазерного облучения ...	71
Глава 4. ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОЧИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕДУРЫ ОПТОПОРАЦИИ	75
4.1 Схема процедуры оптопорации	75
4.2 Оптимизация режимов облучения непрерывным лазером	76
4.3 Оптимизация режимов облучения импульсным лазером	79
Глава 5. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЛАЗМОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ОПТОПОРАЦИИ.....	82
5.1.1 Оптопорация непрерывным лазером	83
5.1.2 Оптопорация импульсным лазером.....	85
5.2 Оценка эффективности оптопорации для доставки пДНК и временной трансфекции в клетках HeLa.....	86
5.2.1 Получение высокоочищенных препаратов пДНК	86
5.2.2 Опототрансфекция непрерывным лазером.....	87
5.2.3 Опототрансфекция импульсным лазером.....	88
5.3 Опототрансфекция «трудно трансфицируемых» клеток А431	90

5.4 Получение клеточной линии HeLa со стабильной экспрессией гена флуоресцентного белка.....	92
Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ	94
6.1 Связь плазмонных свойств слоев НЧЗ с эффективностью оптопорации.....	94
6.2 Длительность самовосстановления клеток после оптопорации.....	98
6.3 Изучение механических свойств клеток.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	103
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Генная терапия является одной из наиболее перспективных и активно изучаемых современных технологий, которая открывает новые возможности в медицине, делая ее персонифицированной, высокоспецифичной и эффективной. Несмотря на большое количество исследований в данной области, до сих пор не существует единой технологии для эффективной внутриклеточной доставки целевых веществ, в частности, нуклеиновых кислот (НК). Очевидно, что препараты НК не могут быть введены в организм в свободном виде, вследствие их деградации иммунной и ферментативной системами. Кроме того, наличие естественного барьера в виде плазматической мембраны препятствует свободной интернализации генетических конструкций в клетки. Относительно большие размеры молекул НК, наличие отрицательного заряда, характерного для клеточной мембраны, ограничивают их свободное проникновение в цитозольное пространство за счет систем клеточного транспорта. Для успешного продвижения в клиническую и лабораторную практику системы доставки должны удовлетворять целому ряду требований, определяющих их эффективность, биосовместимость, универсальность (применимость для различных типов клеток, тканей, организмов и доставляемых объектов), низкую себестоимость и простоту исполнения. Наиболее распространенными и применяемыми в лабораторной и/или клинической практике системами внутриклеточной доставки НК являются системы на вирусной и безвирусной основе с использованием различных химических агентов и/или физических воздействий [1]. Одной из наиболее перспективных и интенсивно изучаемых стратегий доставки НК являются системы на основе микро- и наночастиц (НЧ), которые инкапсулируют или адсорбируют молекулы НК [2], что приводит к улучшению способности проникновения в клетки и повышению эффективности трансфекции. Наиболее популярным классом наноматериалов (НМ),

используемых в качестве основы для создания систем внутриклеточной доставки являются наночастицы золота (НЧЗ) [3]. Преимущества НЧЗ обусловлены уникальным набором физико-химических свойств [4], таких как низкая цитотоксичность и иммуногенность, наличие доступных протоколов воспроизводимого и масштабируемого химического синтеза и функционализации биоспецифическими лигандами, молекулами и пр.

Помимо выбора носителя для доставки генетического материала при создании технологии трансфекции, немаловажную роль играют способы доставки, среди которых известны механические (баллистический, использование микроинъекций) [5], химические (реагенты для трансфекции [4]), или физические (электропорация [6], ультразвук [7], лазерная трансфекция или оптопорация [8]) методы. В последнее время активно исследуется оптическая трансфекция клеток с использованием НЧЗ [9, 8]. Принцип метода состоит в усилении энергии лазерного излучения плазмонно-резонансными НЧ, локализованными вблизи клеточных мембран, что приводит к кратковременному увеличению проницаемости последних для целевых молекул [9]. Несмотря на высокую производительность и простоту, эта методика основана на инкубации клеток с суспензией НЧ [10]. Неспецифическая и неконтролируемая адсорбция НЧ на мембране и/или проникновение в цитозоль может негативно отразиться на жизнеспособности клеток, и эффективности трансфекции.

Работа посвящена разработке и детальному изучению новой системы внутриклеточной доставки, его оптимизации и адаптации для различных типов клеток. Принцип метода состоит в увеличении проницаемости мембран клеток, выращенных на монослоях НЧЗ, под воздействием ИК лазерного облучения, и эффективном проникновении биомолекул за счет достигнутого увеличения проницаемости мембран [11]. Система работает по принципу плазмонно-индуцированной оптопорации: воздействие лазерного облучения на НЧЗ вызывает локальный нагрев частиц и их микроокружения, включая поверхность клеток, находящихся вблизи слоя НЧЗ. Наряду с высокими значениями эффективности (до 95%) и жизнеспособности (до 98%) [12], отличительной

особенностью предлагаемого метода является возможность настройки режимов облучения и параметров монослоев НЧЗ в зависимости от индивидуальных параметров клеток и доставляемых объектов. Наиболее простым и дешевым вариантом плазмонной оптопорации являются системы на основе непрерывного источника лазерного излучения. Однако этот подход имеет ряд серьезных ограничений: общий нагрев среды при облучении может негативно отражаться на жизнеспособности клеток, химической стабильности дорогостоящих векторов, приводя к увеличению их расхода. Поэтому, несмотря на сравнительную дешевизну непрерывных источников лазерного излучения лазеров, их применение не получило широкого распространения (редким примером является [13]). Напротив, применение установок с импульсными источниками лазерного облучения (нано- или фемтосекундными) со сравнительно высокой интенсивностью облучения в узкосфокусированном пучке; возможностью настройки индивидуальных параметров световой волны и режимов сканирования объекта считается гораздо более перспективным и многообещающим [14, 15]. Таким образом, к моменту начала исследований по теме диссертации, имелся ряд нерешенных вопросов, связанных с разработкой методических подходов для создания эффективной системы внутриклеточной доставки на основе НЧЗ с применением лазерного облучения. В работе использован импульсный наносекундный 1064-нм с узкосфокусированным пучком и возможностью облучения в режимах 2-D и 3-D сканирования.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлись разработка и оптимизация универсальной системы плазмонной для оптопорации животных клеток.

Для достижения данной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать технологию создания платформ для оптопорации клеток на основе асSEMBлированных НЧЗ на поверхности пластиковых субстратов;

2. Получить модифицированные клетки HeLa со стабильной экспрессией гена флуоресцентного белка и провести сравнение эффективности доставки и жизнеспособности клеток с коммерческими химическими агентами на основе липокатионов;
3. Определить оптимальные режимы облучения и параметры слоев НЧЗ для эффективной оптопорации на модели доставки непенетрирующих красителей в клетки HeLa;
4. Провести апробацию разрабатываемой системы для доставки модельных непенетрирующих агентов и ДНК-плазмид в «трудно трансфицируемые» клетки эпидермоидной карциномы человека A431;
5. С использованием современных микроскопических, аналитических методов и компьютерного моделирования изучить влияние физико-химических параметров слоев НЧЗ и режимов облучения на морфофизиологические показатели клеток для понимания механизмов, лежащих в основе системы оптопорации.

Научная новизна работы

Научная новизна полученных результатов заключается в следующем:

- изучены механизмы, лежащие в основе плазмонной оптопорации клеток на платформах слоев НЧЗ, и проверены рабочие гипотезы поведения отдельных компонентов системы;
- разработана и оптимизирована экспериментальная схема для оптопорации животных клеток на основе асSEMBЛИРОВАННЫХ плазмонных НЧЗ разной геометрии с применением двух источников лазерного излучения (непрерывного или импульсного);
- оценены перспективы разработанного метода для эффективной доставки НК в клетки млекопитающих в сравнении с коммерческими химическими агентами.

Практическая значимость работы

Решение мультидисциплинарного комплекса задач в рамках настоящей работы может быть востребовано в фундаментальных и прикладных исследованиях по тематике диссертации. Фундаментальная значимость полученных результатов состояла в получении новых знаний о механизмах оптопорации и определении ключевых параметров, определяющих эффективность внутриклеточной доставки целевых агентов. Практическая значимость полученных результатов определяется потенциальным применением разработанной системы оптопорации клеток на слоях НЧЗ в лабораторной и клинической практике, и как основы новых разработок в области генной терапии, клеточной инженерии, регенеративной медицины, молекулярной фармакологии и пр. Разработанная в работе оригинальная технология получения слоев НЧ и основанная на них система оптопорации клеток используются в ИБФРМ РАН, Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского, Институте регенеративной медицины Сеченовского университета (ИРМ, г. Москва).

Положения, выносимые на защиту

- Слои золотых нанозвезд с длиной волны плазмонного резонанса в области 800 нм являются наиболее эффективными платформами в ряду исследуемых НЧЗ для оптопорации клеток двумя принципиально различными типами лазеров (с длиной волны непрерывного излучения 808 нм и длиной волны импульсного излучения 1064 нм).
- Возможность регулировки режимов облучения и параметров слоев НЧЗ (длительность облучения непрерывным лазером – 90 с, 45 с и 20 с для слоев с плотностями Au 7, 14 и 28 мкг/см², соответственно) позволяет настраивать систему оптопорации в зависимости от индивидуальных особенностей клеток.
- Эффективность оптотрансфекции ($72 \pm 5\%$) импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800 и жизнеспособности клеток ($91 \pm 7\%$), значительно выше эффективности доставки плазмидной ДНК в трудно трансфицируемые клетки

эпидермальной карциномы человека A431 с использованием Липофектамин 2000 (ЛФ) ($18 \pm 1,2\%$), оказывающим существенный цитотоксический эффект (жизнеспособность $19 \pm 1,3\%$).

- Полное восстановление морфофункциональных показателей и непроницаемости мембран при оптопорации клеток HeLa на слоях НЧЗ непрерывным либо импульсным лазером происходит в течение 30 ч и 5 ч, соответственно, что характерно для процессов регенерации живых клеток в ответ на стрессовое воздействие лазерного облучения.

Личный вклад диссертанта и результаты, полученные совместно с другими исследователями

Экспериментальные результаты получены лично автором в сотрудничестве с д.ф.-м.н. Хлебцовым Б.Н., д.ф.-м.н. Хлебцовым Н.Г., к.х.н. Буровым А.М., к.ф.-м.н. Браташовым Д.Н., Верховским Р.А., к.ф.-м.н. Захаревичем А.М., к.б.н. Ефремовым Ю.М. Общее планирование экспериментов, их обсуждение и подготовка результатов к публикации проводились совместно с к.б.н. Пылаевым Т.Е. На защиту вынесены те положения и результаты, в получении которых роль автора была определяющей.

Апробация работы

Основные результаты диссертации представлялись автором на международных и российских конференциях: 1) VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 12–15 октября, 2020 г.); 2) Saratov Fall Meeting – International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophysics, Saratov (Саратов, 26–28 сентября, 2018 г., 23–27 сентября, 2019 г.); 3) Международная научно-практическая конференция: «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 16–20 сентября, 2019 г.).

Место выполнения работы

Работа выполнена в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН в рамках госбюджетных тем НИР: «Многофункциональные наноматериалы на основе металлических и композитных наночастиц: синтез, характеристика и биомедицинские применения» (№ гос. регистрации 01201359050), «Золотые и гибридные плазмонные наноструктуры для аналитических и биомедицинских применений» (№ гос. регистрации АААА-А17- 117102740100-8), рук. д.ф.-м.н., профессор Хлебцов Н.Г.

Государственные контракты и гранты

Диссертационные исследования были частично поддержаны грантами Российского научного фонда: № 17-74-10090 «Иммобилизованные золотые нанозвезды для высокоэффективной лазерной трансфекции адгезивных клеточных культур» (2017-2019 гг.), руководитель к.б.н. Пылаев Т.Е.; № 18-14-00016 «Наноматериалы на основе плазмонных металлических и гибридных наночастиц для биомедицинских применений», (2018-2020 гг.), руководитель – д.ф.-м.н. Хлебцов Н.Г.; Российского фонда фундаментальных исследований № 16-02-00054а «Гибридные наноструктуры на основе плазмонных частиц и золотых атомных кластеров для SERS биосенсинга и флуоресцентного биоимиджинга» (2016-2018 гг.), руководитель – д.ф.-м.н. Хлебцов Н.Г.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, основной части, содержащей 6 глав, заключения и списка использованных литературных источников (289 наименований). Работа изложена на 137 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и включает 7 таблиц.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Репрограммирование соматических клеток – революционная технология, являющаяся мощным инструментом для новых разработок в таких областях, как генная и клеточная инженерия, регенеративная медицина, фармакология, и пр. Использование современных достижений в области материаловедения, микро- и нанотехнологий позволяет повысить эффективность перепрограммирования *in vitro* и *in vivo* путем разработки стратегий доставки и контроля биофизических и биохимических сигналов. Данный обзор посвящен современному состоянию технологий для генетического перепрограммирования клеток. Представлен критический анализ данных последних пяти лет о существующих методах внутриклеточной доставки, их преимуществ и ограничений на пути к внедрению в клиническую и лабораторную практику; индивидуальных параметрах клеток-мишеней, доставляемых функциональных НК, и механизмов их взаимодействия. Особое внимание уделено рассмотрению оригинальных систем доставки на основе плазмонно-резонансных НЧ, том числе в комбинации с лазерным облучением.

1.1 Основные термины и понятия, история развития технологий клеточной инженерии

В процессе развития клеток млекопитающих из тотипотентной зиготы происходит их функциональная и фенотипическая дифференцировка до зрелого состояния с образованием различных тканей и органов. Медиаторами всех физиологических клеточных процессов являются специфические транскрипционные регуляторные сети. Полностью дифференцированные соматические клетки обычно сохраняют свой фенотип на протяжении всей жизни. Однако известны типы клеток, которые во взрослом состоянии утратили способность к регенерации поврежденных участков ткани, например, клетки центральной нервной системы [16], кардиомиоциты [17], хондроциты [18].

Революционная технология клеточного перепрограммирования (рис. 1.1) позволяет пересмотреть классические представления клеточной биологии о развитии и детерминировании судьбы клеток, и обеспечивает преобразование зрелых соматических в плюрипотентные клетки или в другие клеточные линии [19].

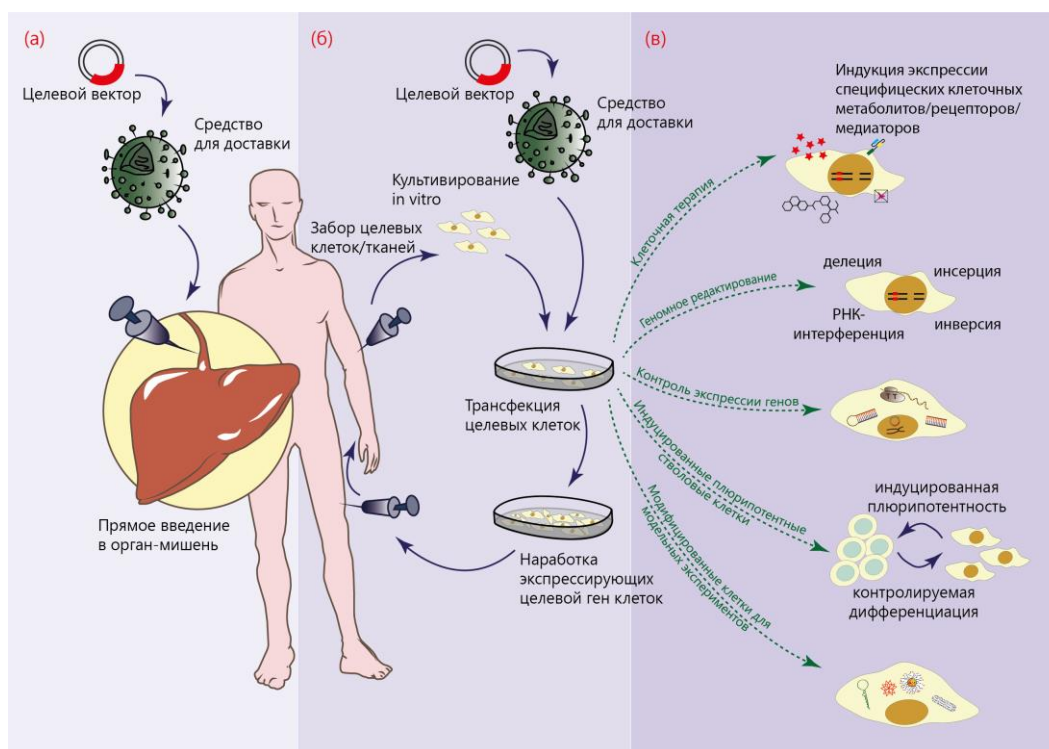


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение концепции генной терапии, реализуемой непосредственно *in vivo* (а), либо с дополнительной стадией *in vitro* модификации клеток (б). Примеры областей практического применения репрограммированных клеток (в).

Процесс введения чужеродной НК в эукариотические клетки принято называть трансфекцией. Термин *трансфекция* этимологически образован от двух понятий, *трансформация* (перенос НК в клетки прокариот) и *инфекция*, а в методологическом контексте берет свое начало от невирусных (т.е. неинфекционных) методов доставки функциональных НК [1]. Основными видами молекул НК, используемых для внутриклеточной доставки, являются кольцевые пДНК, длинные линейные мРНК и короткие ДНК/РНК олигонуклеотиды, а конструкции на их основе принято называть *векторами* [20]. Аналогичным термином *трансдукция* называют введение НК во

внутриклеточное пространство вирусами или вирусными векторами [21], на нем основан принцип действия современных вирусных систем доставки. Однако относительно большие размеры и пространственная конфигурация молекул НК, а также незащищенность от действия ферментативных систем клетки, являются принципиальными ограничениями для свободного прохождения в цитозоль живой клетки за счет естественных систем трансмембранного транспорта. С другой стороны, данные ограничения являются предпосылками для разработки специальных систем доставки, для практического применения в клинических и научных исследованиях, отвечающих современным требованиям экономической эффективности и биобезопасности [22].

Первые успехи репрограммирования дифференцированных соматических клеток обратно в эмбриональные были достигнуты Дж. Гердоном в 1962 г. в экспериментах со шпорцевыми лягушками [23]. Впоследствии это открытие было удостоено Нобелевской премии по медицине в 2012 году вместе с С. Яманака [24]. Фактически, пионерские работы Гердона и Яманаки создали предпосылки для современных исследований в области биомедицинской геной инженерии, или генотерапии. Данная технология главным образом ориентирована на лечение генетически-ассоциированных заболеваний человека путем коррекции дефектных участков генома [25], приобретенных вследствие мутационных изменений и придания клеткам новых функций [26] за счет внесения изменений в геном соматических клеток [27]. Для осуществления замены дефективных участков генома целевых клеток, в них должны быть доставлены экспрессируемые генных конструкции. В октябре 2020 г. Э. Шарпантье и Д.А. Дудна были удостоены Нобелевской премии по химии за открытие одного из самых «острых» инструментов геной технологии генетических «ножниц» CRISPR / Cas9 [28]. Эта революционная технология для высокоточного сайт-направленного геномного редактирования клеток животных, растений и микроорганизмов, имеет огромные перспективы для решения самых разнообразных биомедицинских задач.

1.2 Агенты для внутриклеточной доставки на основе НК

Основными видами НК, используемыми в качестве агентов для доставки в клетки эукариот, являются: ДНК-векторы [29, 30], ДНК/РНК олигонуклеотиды [31-34], матричные РНК [35] (табл. 1). Комбинированное использование таких НК с другими классами функциональных биомолекул, например, редактирующими нуклеазами [36-39], синтетическими внутриклеточными зондами [40, 41], аптамерами [42, 43], ДНК- и РНК-зимами [44, 45] и регуляторными белками [46], позволяет существенно расширить области применения клеточной и генной инженерии в биомедицинской практике.

Ниже приведены основные характеристики НК как агентов для внутриклеточной доставки.

Вектор – молекула кольцевой дцДНК (сконструированная на основе плазмиды, космиды, вирусных векторов, искусственных хромосом), автономно экспрессируемая внутри клеток про- и эукариот, и способная к вертикальной и горизонтальной межклеточной передаче [47]. Идеальная векторная молекула должна обладать способностью к автономной репликации; содержать в структуре селективные маркеры для детекции и сайты для инсерции в клетках-мишенях; иметь низкую иммуногенность и цитотоксичность [48]. Чаще всего для трансфекции используются плазмидные ДНК на основе различных вирусов: лентивирусов [49], аденовирусов [50], герпесвирусов [51, 52], ретровирусов [53], либо аденоассоциированного вируса [54]. Удаление из исходной плазмиды всех бактериальных последовательностей способствует уменьшению размеров вектора, увеличению эффективности трансфекции и экспрессии больших генов без рекомбинации. Конструировать вектор, содержащий экспрессируемый ген и маркер одновременно, чрезвычайно сложно, в таком случае используют ко-трансфекцию – внесение в клетку одновременно двух векторов, с геном и маркером [55].

К *олигонуклеотидным* агентам для доставки относят малые интерферирующие РНК (миРНК), малые шпилечные РНК (shРНК),

антисмысловые (АСО), антигенные и иммуностимулирующие олигонуклеотиды, аптамеры, рибозимы и ДНКазимы. Олигонуклеотиды способны модифицировать поведение клеток с помощью следующих механизмов: активирование толликовых рецепторов в эндосомах; миРНК и имитаторы миРНК; антагомиры; блокирующие эндогенную микро РНК; АСО, вызывающие деградацию РНКазы Н или стерически блокирующие целевую РНК; олигонуклеотиды, направленные против видов ядерных регуляторных РНК, переключающие сплайсинг; антигенные олигонуклеотиды, нарушающие транскрипцию из-за связывания с геномной ДНК; аптамеры, связывающиеся с белками и изменяющие их функцию [56].

Таблица 1 – Характеристика функциональных НК, применяемых для доставки в клетки

Тип НК	Размер, Конформация	Принцип действия	Клетки-мишени	Автор и год открытия, ссылка	Современное применение
пДНК	5–10 т.п.н., кольцевая дцДНК	Временная или конститутивная экспрессия (геномная инсерция)	Про- и эукариоты	Jackson D.A., Cohen S.N., 1970 г. [57, 58].	[29, 30]
АСО	Олиго-оц/ дцДНК / РНК	ингибирование трансляции мРНК хозяина	Про- и эукариоты	Stephenson M.L., 1978 г. [59].	[31, 32]
миРНК, микроРНК	Олиго-дцРНК	РНК-интерференция	эукариоты	Fire A., 1998 г. [60].	[33, 34]
мРНК	0,5–10 т.н. Линейная оцРНК с петлями и шпильками	экспрессия опухолевых антигенов в дендритных клетках и Т-клетках	эукариоты	Brachet J., 1970 г. [61, 62]	[35]
Аптамеры	20-60 н. Олиго-оцДНК/РНК	Модуляция или супрессия экспрессии таргетных генов	эукариоты	Ellington A.D., Tuerk C., 1990 г. [63, 64]	[42, 43]
ДНК/РНК-зимы	Олиго-оцДНК, Олиго-оцРНК	Катализаторы	Про- и эукариоты	Woese C., 1967 г [65]	[44, 45]

В 1998 году было открыто явление *РНК-интерференции*, основанное на действии коротких двуцепочечных молекул миРНК (21-22 п.о.), подавляющих экспрессию генов [60]. При попадании в цитоплазму образуются миРНК-

белковые сайленсинг комплексы, связывающиеся с мРНК и индуцирующие её ферментативную деградацию. Это дает принципиальную возможность выключить, по существу, любой ген, что вызывает огромный интерес в фундаментальной и прикладной биологии. Ожидается, что в некоторых случаях выключение гена при помощи миРНК может давать терапевтический эффект. Взаимодействие миРНК и их мишеней сопровождается деградацией или обратимой/необратимой блокировкой трансляции хозяйских/вирусных мРНК. Результатом РНК-интерференции может быть ослабление прогрессии, в частности, онкологического заболевания. Преимущества использования РНК-интерференции состоят в высокой специфичности и эффективности, а также в низкой токсичности индуцированных ею процессов. Индукция сайленсинга миРНК перспективна как в отношении отдельных генов, так и более крупных локусов хромосом. Однако существует проблема доставки миРНК к мишеням, поскольку введение нативных миРНК сопровождается их деструкцией ферментами (эндонуклеазами).

В клетках имеется еще один молекулярный механизм запуска молчания генов – shРНК, небольшие «шпильки» которых разрезаются энзимами на более мелкие фрагменты, гибридизующиеся с антисмысловой матричной цепью и блокирующие таким образом экспрессию генов-мишеней [66, 67].

На эффективное проникновение олигонуклеотидов внутрь клетки влияют их химические и размерные свойства. Олигонуклеотиды склонны взаимодействовать с отрицательно заряженными клеточными мембранами, поскольку тоже являются отрицательно заряженными, и, как следствие, проницаемость клеток низкая. Размеры их варьируются от 13 до 25 нуклеотидов и имеют приблизительные размеры около 5×1 нм (АСО) и 7.5×2 нм (дуплексы миРНК). Для эффективной доставки олигонуклеотиды подвергаются нейтрализации отрицательных зарядов, предотвращая отталкивание между ними и клеточными мембранами, и химической модификации, чтобы снизить восприимчивость к ферментативному расщеплению и связыванию с нежелательными мишенями [68, 69].

Одной из альтернатив доставки векторов ДНК является использование *матричной РНК (мРНК)*. По сравнению с экспрессией ДНК-векторов, экспрессия белка мРНК при внутриклеточной доставке имеет следующий ряд преимуществ: нет риска неблагоприятной геномной деградации; экспрессия основана на взаимодействии с рибосомами и не требует доставку через ядерную мембрану; экспрессия белка при доставке мРНК является дозозависимой и быстрой и начинается в течение нескольких минут; возможность дополнительного контроля экспрессии белка; мРНК может быть менее токсичной и менее иммуногенной, чем ДНК-векторы [70, 71]. Все эти детали доставки мРНК делают ее привлекательной для таких терапевтических применений, как иммунотерапия для ликвидации рака, где использовалась внутриклеточная доставка мРНК для экспрессии опухолевых антигенов в дендритных клетках и Т-клетках *ex vivo* [72]. Однако недостатки использования мРНК, которые можно обойти с помощью химических модификаций, заключаются в том, что она может вызывать иммунный ответ или быть нестабильной [73]. Молекула мРНК представляет собой отрицательно заряженную одноцепочечную структуру, образуя вторичные структуры с различными петлями и шпильками, размеров мРНК колеблется от 500 до 10000 нуклеотидов (~ 10-100 нм), который можно конденсировать для уменьшения размера и ускорения поглощения [74].

Следует отметить, что, несмотря на большое разнообразие и потенциал функциональных НК, ни один из вышеперечисленных типов не обладает исчерпывающим набором параметров для эффективной внутриклеточной доставки в свободном виде.

1.3 Системы внутриклеточной доставки: принципы действия, проблемы и перспективы

Влияние естественных физиологических барьеров на системное введение НК накладывает серьезные ограничения на перенос вновь разработанных технологий доставки генотерапевтических средств от модельных клеточных систем в реальную клиническую практику. Помимо внеклеточных барьеров, главным образом со стороны иммунной (специфические макрофагальные реакции) и пищеварительной (деградирующие ферменты) систем, необходимо также учитывать наличие внутриклеточных барьеров – клеточной мембраны, систем лизосомальной деградации и экзоцитоза, а также генетического аппарата. Традиционным путем проникновения крупных молекул в клетку является эндоцитоз, подразделяемый на фаго- и пиноцитоз. Способность к фагоцитозу имеется лишь у некоторых типов клеток, таких как макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки [75]. Напротив, пиноцитозный путь имеется практически у всех животных клеток, и осуществляется по типу клатрин- и кавеолин-опосредованного либо неклатринового эндоцитоза [76, 77], макро- и микропиноцитоза [78].

Несмотря на огромное количество проведенных исследований, до сих пор не определены точные механизмы и ключевые факторы, задействованные в процессе прохождения экстраклеточных НК, а также характерные ответные реакции со стороны клетки [79, 80, 81]. В связи с этим, имеет смысл обсудить последние данные по разнообразию методов доставки НК, гипотетических рабочих механизмов, их преимуществ, недостатков и дальнейших практических перспектив. На рисунке 1.2 схематически изображены наиболее известные системы доставки и принципы их действия, более подробное описание представлено в нижеследующих подразделах.

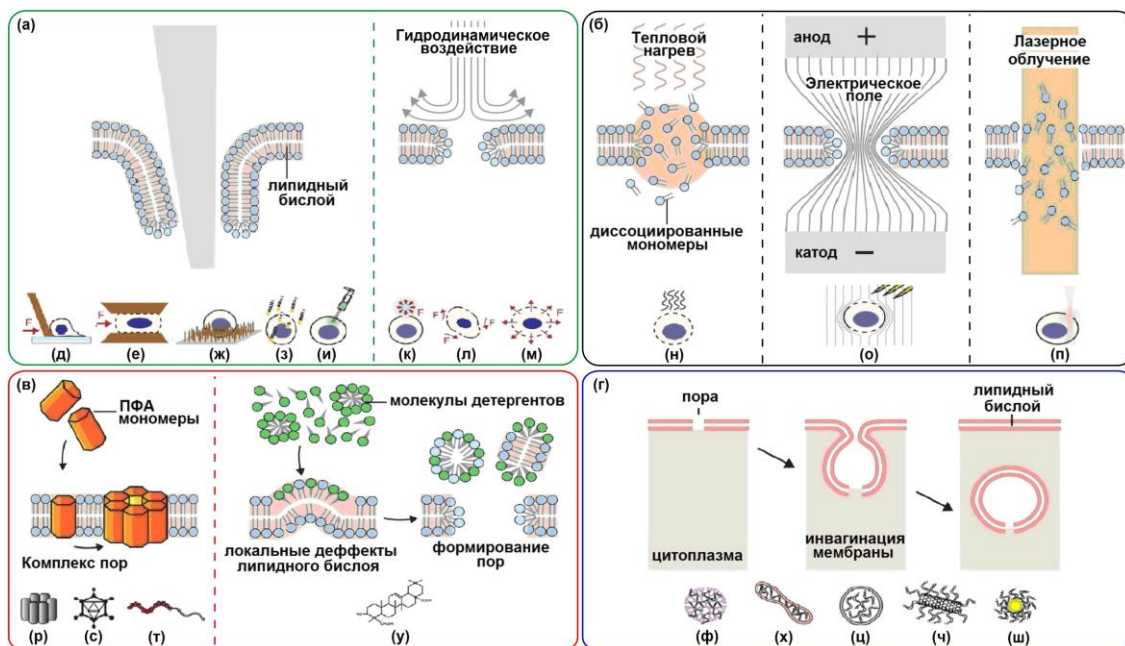


Рисунок 1.2 – Схематическое изображение систем доставки НК и базовых принципов их работы. Механическое воздействие (а): соскабливание клеток с субстрата (д), сдавливание клеток (е), наноиглы (ж), «генная пушка» (з), микроинъекция (и), образование кавитационных пузырьков (к), гидропорация (л), осмотическая перфорация (м); электромагнитное воздействие (б): тепловое воздействие (н), электропорация (о), оптопорация (п); химические воздействия (в): порообразующие пептиды (р), вирусы (с), конъюгированные молекулы (т), детергенты (у); эндоцитоза (г): полимерные НЧ (ф), фантомы клеток (х), липидные НЧ (ц), углеродные нанотрубки (ч), неорганические НЧ (ш). Адаптировано из [82, 1].

1.3.1 Редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9

Кластеризованная система регулярно чередующихся коротких палиндромных повторов (CRISPR – the clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / CRISPR – ассоциированная нуклеаза 9 (CRISPR-associated nuclease 9) (CRISPR / Cas9), полученная из приобретенной иммунной системы у бактерий и архей [83], обеспечила новый инструмент для точной манипуляции геномной последовательностью для достижения терапевтического результата. Преимущество CRISPR, которое сделало его легким и гибким инструментом для различных целей редактирования генома, заключается в том, что один белковый комплекс (Cas9) с двумя короткими последовательностями РНК функционирует как сайт-специфическая эндонуклеаза [84]. Система CRISPR / Cas9 демонстрирует новую эру в исправлении генных дефектов для лечения многочисленных заболеваний человека с помощью генной терапии [85], но все

еще необходимо решить ряд технических проблем, связанных с точностью и эффективностью, с различными Cas9-опосредованных внецелевых событий (неконтролируемая репарация и реорганизация или моделирование генома) [86, 87], с разработкой методов синхронизации клеточного цикла для контроля времени передачи белковых комплексов Cas9 и таргетирование нецелевой нити ДНК [88, 89].

1.3.2 Биологические системы

Вирусные системы являются наиболее часто используемыми в лабораторной и клинической практике [90, 91]. Структурно такие системы представляют собой модифицированные вирусные частицы с капсидом и вставок целевых генов в вирусный геном, способных к интеграции и геномной либо эписомальной экспрессии в клетках-мишенях. Белковый капсид выполняет роль контейнера для мультивалентной загрузки НК и защищает их от ферментативной деградации [92]. Механизм проникновения таких векторов (рис. 1.2 в) в целом похож на природный путь инфицирования клеток вирусами, за исключением заблокированной экспрессии вирусных генов, составляющей основу их патогенности [93]. Это достигается заменой кодирующих областей вирусного генома на целевые фрагменты НК при конструировании векторов.

Проникновение большинства вирусных векторов во внутриклеточное пространство происходит путем кавеолин-зависимого эндоцитоза [20]. Однако у некоторых векторов наблюдается фузогенный потенциал, который обеспечивает возможность слияния напрямую с целевой мембраной [94]. Было показано, что клеточный актин принимает активное участие в адсорбции вирусов на клеточной поверхности, формируя микросетевой кортекс под плазматической мембраной клетки [95]. После начального контакта с клеткой вирус перемещается по ее поверхности и собирает компоненты рецепторного комплекса, этот процесс и последующее начало эндоцитоза также осуществляется при участии актиновой микросети [96].

Вирусные векторы были разработаны на основе широкого спектра природных вирусов, включающих промоторы с высоким уровнем экспрессии гетерологичных генов [20]. Вирусные частицы различаются по составу, размеру и морфологии капсида. Они встречаются в виде наносфер размером от ~ 20 нм (например, аденоассоциированный вирус) [97] до ~ 100 нм (например, аденовирус) [98]; коротких (~ 300 нм; например, вирус табачной мозаики) [99] и длинных наностержней (~ 700 нм; например, вирус *Stygiolobus*) [20]; червеобразных частиц (~ 1 мкм; например, вирус Эбола) [100]; и других форм, таких как эллипсоидных и кубических форм (например, *Convivator Acidianus*) [101].

К основным преимуществам вирусных векторов относится высокая эффективность доставки, возможность использования в системах *in vivo* и *in vitro*. За последние два десятилетия было проведено более 1800 клинических испытаний, часть из них завершены, либо продолжаются до сих пор, и получили одобрение на клиническое использование во всем мире в более чем 30 странах [102]. Однако в результате этих испытаний во всем мире было получено только пять продуктов: Гендицин, Онкорин, Рексин G, Неоваскулген и Глибера (*Glybera*) [103]. Применение *Glybera* для лечения пациентов с семейной недостаточностью липопротеинлипазы (LPLD) было одобрено Евросоюзом, но через некоторое время было ограничено [104]; другие препараты для лечения онкозаболеваний, ишемии миокарда, мышечной дистрофии Дюшенна и болезненной диабетической невропатии в настоящее время проходят III фазу клинических испытаний [79]. В подавляющем большинстве (~ 90%) клинических испытаний использовались вирусные векторы, такие как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы или ретровирусы. Однако существующие риски в виде потенциальной цитотоксичности, иммуногенности и возврата к патогенности исходного вируса накладывают принципиальные ограничения на клиническое применение вирусных векторов [105]. Более того, возрастает вероятность онкогенеза из-за спонтанного инсерционного мутагенеза при интеграции векторной ДНК в геном хозяина [106]. Среди прочих недостатков следует отметить ограниченную плотность упаковки ДНК, сложность в производстве, широкий тропизм и дороговизну вирусных систем.

1.3.3 Химические системы

Невирусные системы доставки представлены свободными НК [107], либо ассоциированными с различными по химической природе молекулярными носителями и НМ [107]. В многочисленных исследованиях, посвященных химическим системам доставки НК, была показана необходимость наличия свободных положительно заряженных группировок для облегчения взаимодействия с анионной поверхностью липидного бислоя мембран клетки и эффективного переноса целевых генов [108]. Связывание компонентов (преимущественно, катионной природы) невирусных векторов и отрицательно заряженных дуплексов НК между собой происходит главным образом посредством электростатических сил [109]. Рассмотрим более подробно наиболее известные типы невирусных систем внутриклеточной доставки.

Композит фосфата кальция (CaP), созданный в 1973 г. [110], является первым упоминанием о невирусных носителях НК. Это биосовместимый и разлагаемый материал, способный образовывать комплекс с НК и успешно доставлять их в клетки [79].

Липокомплексы (также называемые «липоплексами» или катионными липидами) [111] представлены гидрофобными группами жирных кислот с включенными аминогруппами (рис. 1.2 ц), способствующими взаимодействию с нуклеотидами. Гидрофобные фрагменты способствуют образованию двухслойных везикул в водной среде. С момента опубликования в 1987 году пионерской работы по системам на основе липидных носителей, в частности N-[1-(2,3-диoleyлокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония [112], был синтезирован и изучен целый ряд катионных липидов для доставки целевых генов [113]. Однако существующие системы не лишены принципиальных недостатков, связанных с неудовлетворительной химической стабильностью и недолговечностью (быстрым клиренсом НК) комплексов, потенциальными иммуно- и цитотоксичностью [105].

Другой многообещающей системой доставки НК являются *липидные НЧ*, созданные на основе липидных молекул. Во внеклеточном пространстве эти носители имеют нейтральный заряд, который обеспечивает длительное время циркуляции и более высокую степень поглощения раковыми клетками, а при попадании в эндосомы они приобретают положительный заряд, способствующий высвобождению целевых НК [114]. В качестве примера, иллюстрирующего развитие данной технологии в области создания генотерапевтических средств для подавления роста раковых клеток, можно привести работу [115], однако для достижения высоких показателей эффективности клеточного поглощения [116] и эндосомного высвобождения [117] в системах *in vivo* требуется проводить большое количество время- и финансово затратных исследований и испытаний.

Проникающие в клетки пептиды (ПКП, от англ. cell penetration peptide, CPP) представляют собой пептидные домены длиной около 20 аминокислот (рис. 1.2 р), способные переносить молекулы через липидный бислой за счет высокой специфичности к поверхностным мембранным рецепторам [118]. Системы доставки на основе ПКП классифицируются на ковалентно и электростатически связанные. Общий принцип их действия заключается в следующем: ПКП приближаются к клеточной мембране как растворимые агенты, связываются с поверхностью клетки, олигомеризуются и вставляются в виде собранного комплекса пор (рис. 1.2 в) [119]. Наиболее часто используемым ПКП для различных клеточных моделей *in vitro* и *in vivo* [120] является ТАТ-пептид (ТАТр), полученный из белка активатора транскрипции, кодируемого вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) [121]. В недавней работе было продемонстрировано использование носителей на основе ПКП для доставки комплекса Cas9 белок-РНК, нацеленных на геномное редактирование клеток человека [122].

Самоорганизующиеся системы, называемые «полиплексами» или просто «комплексами» [123], представлены *катионными макромолекулами*, с функциональными группами, протонирующимися при физиологических показателях рН, способными образовывать обратимые комплексы с отрицательно заряженными фосфатными группами азотистых оснований [124]. Катионные макромолекулы

могут быть синтетическими, например, поли-(L-лизин) [125], полиэтиленимин [126] и дендримеры [127], или природными, такими как поли-(D, L-молочная кислота) [128] и хитозан [129]. С использованием метода изотермической калориметрии титрования Матулис с соавт. [130] предложил модель двухэтапного процесса упаковки ДНК поливалентными катионами: (1) связывание катиона с ДНК посредством неспецифических электростатических сил, приводящее к нейтрализации и уменьшению отталкивания зарядов нуклеотидов, и, следовательно, к увеличению гибкости цепей; (2) управляемое энтропией после достижения критической концентрации лиганда взаимодействие ДНК-ДНК и конденсация в самоорганизующиеся системы [130]. Было замечено, что образование более рыхлых и крупных комплексов НК происходит при использовании высокомолекулярных полимерных катионов, например, хитозана или полиэтиленимина (ПЭИ), чем в случае использования мнововалентных катионов [131]. Полиплексы, содержащие аминокислоты с близкими к физиологическому рН значениями рK_{ас}, приводят к лучшей экспрессии трансгена, работающими по принципу «протонной губки» [109]. Гипотеза «протонной губки» была предложена для описания механизмов индукции эндосомального разрушения и предотвращения лизосомальной деградации НК: эволюция фаз созревания эндосом сопряжена с перемещением протонов с помощью АТФ-азных протонных насосов из цитоплазмы в эндосомы [132]. Основными преимуществами систем доставки на основе катионных макромолекул являются простота функционализации и возможность специфического связывания с целевыми НК, более высокие показатели химической стабильности и биосовместимости по сравнению с липоплексами [123].

Следует отметить, что, несмотря на существенные усилия со стороны исследователей, и достижениями в области создания невирусных векторов, способных защищать НК от деградации, обеспечивать специфическое нацеливание на клетки, способствовать клеточному захвату и вызывать минимальную цитотоксичность и иммуногенность, эффективность трансфекции ими клеток млекопитающих по-прежнему уступает вирусным системам [109].

1.3.3.1 Системы доставки на основе наноматериалов

Одной из наиболее перспективных и интенсивно изучающихся стратегий доставки генетического материала являются системы на основе микро- и НЧ, [133, 134]. Системы доставки на основе НЧ работают по принципу баллистических векторов, способных «протаскивать» целевые НК сквозь мембрану благодаря своему малому размеру и особым физико-химическим свойствам. Кроме того, высокое соотношение поверхности к объему позволяет нагрузить большое количество НК, и таким образом повысить эффективность трансфекции. Рассмотрим наиболее известные системы доставки на основе НМ, классифицируемых по химической природе.

Системы на основе *НЧ из неорганических элементов* (рис. 1.2 ш) отличаются высокими показателями механической прочности, биоинертности и химической стабильности. Они могут быть получены в различных размерных диапазонах (от 2-3 до 100-150 нм), с настраиваемыми физико-химическими параметрами и возможностью дополнительной модификации поверхности многофункциональными лигандами [135]. С другой стороны, потенциальная нанотоксичность является серьезной проблемой для многих неорганических НЧ, особенно содержащих атомы тяжелых металлов (например, Cd), что требует введения дополнительного биосовместимого поверхностного лиганда [136].

Два других типа неорганических НЧ на основе кремния [137] и суперпарамагнитного оксида железа [138], были предложены в качестве носителей НК из-за их высокой степени загрузки и контролируемого биораспределения, соответственно, однако отсутствие способности эндосомальной деградации ограничило их дальнейшее применение.

Отличительными особенностями носителей на основе НЧ *диоксида кремния* являются их высокая биосовместимость, возможность регулировки диаметра синтезируемых частиц и рН-зависимого управления размером пор [139], а также высоким сродством к адсорбции на поверхности НК [140].

Полупроводниковые НЧ или *квантовые точки (КТ)* могут быть синтезированы с использованием жидкофазной коллоидной химии в диапазоне размеров 3-10 нм [141]. Известны работы по применению КТ, покрытых пористой кремнеземной или полимерной оболочкой, для поливалентной нагрузки и доставки НК [142].

Системы для трансфекции на основе *плазмонных НЧ*, главным образом золотых [143-145], считаются одними из наиболее перспективных, благодаря уникальным свойствам НЧЗ, таких как простота и масштабируемость синтеза с заданными плазмонными свойствами и геометрическими параметрами, низкая иммуногенность, биоинертность [4], и возможность функционализации различными биомолекулами, в том числе НК [146]. Помимо физико-химической стабильности и низкой токсичности, главное преимущество металлической структуры золота заключается в двух фактах. Они обладают чрезвычайно сильными светопоглощающими свойствами для генерации локального плазмонного нагрева [147] при воздействии источником электромагнитного излучения (например, лазерного) с длиной волны в области ПР. Настраивать резонансную длину волны поглощения НЧЗ можно достаточно легко путем изменения формы либо введения поверхностного модификатора, во всем видимом и до ближнего ИК-диапазона, так называемого окна прозрачности биотканей из-за малого поглощения и рассеяния [148].

Магнитные НЧ размером от 5 до 50 нм, представленные главным образом НЧ оксидов железа, таких как Fe_3O_4 , $\alpha-Fe_2O_3$ и $\gamma-Fe_2O_3$, обладают уникальными суперпарамагнитными свойствами [149]. Магнитные НЧ широко используются для таргетированной доставки лекарственных препаратов и генов, благодаря нацеливанию терапевтических агентов с помощью направленного магнитного поля.

Полимерные НМ зарекомендовали себя как эффективные носители для доставки НК (рис. 1.2 ф) благодаря лабильности химических свойств, вариабельной геометрией доступной для модификации поверхностью [150]. Помимо хорошей биосовместимости и биоразлагаемости, особым

преимуществом биоорганических НЧ является управляемый выход целевых агентов. Он может осуществляться пассивными (например, изменение рН в гидрогеле, приводящее к набуханию [151]) либо активными (например, фотодеградация лабильных связей в основной цепи полимера [152, 153]) механизмами. Наконец, необходимо отметить, что некоторые гидрофильные полимеры, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), хитозан и декстран, широко используются в качестве покрывающих агентов НЧ для повышения их водной диспергируемости, биодоступности и таргетирования [154, 155].

Дендримеры представляют собой компактные (менее 20 нм) супрамолекулярные структуры, состоящие из упорядоченных фрактальных органических доменов [156]. Отличительной особенностью носителей на их основе является управляемая десорбция доставляемых агентов путем прикрепления целевых генов к домену дендримера методами клик-химии. Химический состав внешней короны в дендримере также можно использовать для покрытия ПЭГ [157].

Углеродные наноструктуры (рис. 1.2 ч), среди них фуллерены, углеродные точки, углеродные нанотрубки (УНТ) и графеновые точки. УНТ обладают уникальными вязкоупругими и электромагнитными свойствами особенно полезными для создания носителей НК [158]. УНТ обладают уникальным свойством эндоцитоз-независимого проникновения в клетки благодаря так называемому «игольчатому» механизму и могут полностью избегать эндосомного барьера [159]. УНТ могут содержать на своей поверхности функциональные группы, что облегчает их конъюгацию с диагностическими / терапевтическими / биотаргетирующими агентами [160]. *Углеродные точки*, типичный размер которых составляет менее 10 нм, представляют собой важный класс флуоресцентных материалов и обеспечивают потенциальное применение в биомедицине [161]. Они обладают высокой устойчивостью к фотообесцвечиванию, лучшей биосовместимостью и меньшей токсичностью по сравнению с полупроводниковыми КТ, а также легко функционализируются [162]. *Графеновые точки* – это двумерная аллотропная модификация углерода,

образованная слоем атомов углерода толщиной в один атом [163]. Большая плоская поверхность позволяет загружать множество типов целевых НК одновременно с обеих сторон (вверху и внизу) при большой мощности с использованием π - π -сопряжения или физической адсорбции [164].

1.3.4 Системы доставки на основе физических воздействий

Помимо описанных выше вирусных и невирусных систем доставки, альтернативным вариантом являются системы на основе физических воздействий, с применением механической силы либо различных источников электромагнитного поля.

Механическое воздействие на липидный бислой мембраны клетки (рис. 1.2 а) вызывает деформацию растяжения в плоскости и может привести к частичному разрушению (около 2–3%) [165], и таким образом, облегчить проникновение целевых агентов. Такое воздействие может осуществляться прямым контактным способом (рис. 1.2 д-и) [1], путем гидропорации (рис. 1.2 к, л) [166] или осмотической перфорации (рис. 1.2 м) [167]. Показано, что величины площади соприкосновения и скорости деформации определяют характер повреждений бислоя: либо моментальное разрушение, либо истощение вязкоупругих свойств на начальной стадии [168]. Согласно данной гипотезе, воздействие острыми микроиглами относительно малого диаметра, способствует быстрому проникновению [168]. Напротив, «тупое» и относительно более медленное воздействие может инициировать наступление осмотического шока, прежде чем вызывать разрушение липидного бислоя [168].

Микроинъектирование является самым первым методом доставки, основанным на прямом проникновении тонким капилляром сквозь клеточную мембрану (рис. 1.2 и). С момента изобретения в 1911 году [169] микроинъектирование широко используется для доставки различных агентов, в первую очередь НК [170]. Однако микроинъекция является крайне трудоемкой процедурой, предназначенной для работы с индивидуальными,

предпочтительно, крупными клетками. Несмотря на очевидные ограничения, связанные с низкой производительностью, размером и типом клеток-мишеней, метод микроинъектирования успешно применяется в современной клинической практике [171], наглядным примером является процедура экстракорпорального оплодотворения человека.

Электрический заряд непроводящих липидных бислоев и постоянно присутствующие тепловые флуктуации создают и расширяют гетерогенную популяцию пор [172]. Воздействие дополнительного электрического поля (метод *электропорации*, рис. 1.2 о) порождает дефекты бислоя термического происхождения из-за превышения мембранного потенциала на 0,2 В, молекулы липидов преодолевают свой энергетический барьер и расширяются в гидрофильные поры размером 1 нм или более. Поскольку поры малого размера обладают плохой электропроводностью, их рост энергетически выгоден при приложенном поле, с замедлением по достижению определенного размера [173]. В зависимости от ориентации электрического поля эти маленькие поры могут неравномерно распределяться по поверхности клетки [173]. Следует упомянуть о двух серьезных недостатках метода электропорации: плохой выживаемостью электропорированных клеток [174] и совместимостью только с суспензионными культурами клеток. Первый обусловлен невозможностью тонкой оптимизации системного воздействия электрического поля под конкретный тип клеток, второй существенно ограничивает области применения для многих типов адгезионных клеток. Тем не менее, в настоящее время произведен целый ряд активно используемых коммерческих электропораторов, таких как система трансфекции неона (Thermal Fisher Scientific) и система 4D-нуклеофектора (Lonza).

1.3.4.1 Лазерная трансфекция клеток

Доставка чужеродных объектов в клетку за счет индуцируемой воздействием световой волны повышенной проницаемости клеточной мембраны, называют оптопорацией, оптоинъекцией или лазерной инфекцией.

Различают три основных типа оптических систем доставки. Первый из них, прямая фотопорация [175], осуществляется узко сфокусированным лазерным облучением. Вторым типом – оптопорация, опосредованная фотосенсибилизирующими НЧ [176], эффективно поглощающими энергию лазерного излучения и вызывающими локальные повреждения липидного бислоя за счет фототермических эффектов. Третий подход основан на фототермических эффектах светочувствительных субстратов [177, 178] для культивирования клеток, активирующихся при лазерном облучении.

Прямая фотопорация была впервые описана в 1984 году на примере доставки пДНК с использованием наносекундного (нс) Nd: YAG УФ-лазера [179]. В последующие годы нс Nd: YAG УФ-лазер [180] и лазер на иттрий-алюминиевом гранате с третьей гармоникой (355 нм) [181] были использованы для трансфекции в различные типы клеток. В 2002 году было продемонстрировано применение фемтосекундного (фс) ИК-лазера с длиной волны 800 нм для локальной перфорации клеточной мембраны [182]. Помимо доставки НК, прямая оптопорация используется для загрузки множества внутриклеточных меток. Импульсный 532-нм Nd: YAG лазер был использован для пространственно контролируемой доставки модельных молекул красителей путем задания области лазерного сканирования [183]. Было показано, что сублетальные дозы лазера приводят к незначительным повреждениям клеток, а возврат состояния клеточной мембраны к интактному происходит за очень короткое время [184]. Пикосекундный (пс) Nd:YAG-лазер (1064 нм, длительность импульса 17 пс) также использовался для перфорирования единичных растительных клеток растения, и доставки пропидия йодида (ПИ) [184]. С момента появления доступных коммерческих фс-лазерных источников, генерирующих многофотонные эффекты, их применение стало более предпочтительным, чем нс-лазеров, за счет одновременного повышения эффективности перфорации и общей выживаемости клеток [185]. Учугонова и др. использовали 20 фс 792-нм лазер с очень низкой мощностью лазера для доставки бромистого этидия [185]. Меченные ФИТЦ молекулы морфолина (1,8

кДа) и декстрана (10 кДа) были доставлены прямой оптопорацией 120 фс 800-нм лазером в отдельные клетки эмбрионов рыбок данио и в клетки куриных эмбрионов, эффективность доставки составляла около 71% [186].

Несмотря на высокую эффективность и слабую цитотоксичность, пропускная способность прямая оптопорация достаточно низкая. Действительно, повреждения создаются одни за другими при прецизионной фокусировке луча точно на клеточную мембрану. Для увеличения пропускной способности был предложен «недифрагирующий» пучок Бесселя, который сочетает в себе небольшой диаметр пучка с почти бесконечной глубиной фокуса [187]. В сочетании с микрожидкостным чипом пучок Бесселя (800 нм, 140 фс) может достигать 26,6% ПИ⁺ клеток с пропускной способностью 10 клеток/с [187].

Оптопорация, опосредованная НЧ. Следует отметить, что быстрые и ультракороткие лазеры очень дороги и требуют тщательной оптической юстировки. В связи с этим, дальнейшее развитие методов оптопорации было связано с использованием сенсibiliзирующих НЧ или микро- и наноструктурированных субстратов [188]. В общем виде, процедура выглядит следующим образом: клетки инкубируют с сенсibiliзирующими НЧ, например, НЧЗ. Затем монослой клеток подвергается лазерному воздействию, возникающие фототермические эффекты НЧ, приводят к локальному увеличению проницаемости мембраны. Наиболее распространенными фототермическими эффектами являются нагрев до критической температуры или образование кавитационных нано- и микропузырьков за счет быстрого испарения воды, окружающей НЧ [175]. После поглощения НЧ лазерного импульса происходит быстрое (10–1000 нс) расширение и схлопывание кавитационных пузырьков с высвобождением локализованной механической силы, которая разрушает клеточную мембрану [189]. В последние годы данные эффекты особое привлекают внимание исследователей, поскольку их генерация возможна с использованием менее дорогих импульсных нс-лазеров [190, 191].

Лапотко с соавт. использовали золотые наносферы (НСф) и наноболочки в качестве сенсibiliзирующих НЧ под воздействием импульсного лазерного

света (70 пс) для доставки ФИТЦ-декстрана в CD3-положительные клетки Jurkat [192]. Xiong и др. продемонстрировали эффективную (более 90%) доставку меченых декстранов разной молекулярной массы в несколько клеточных линий, используя НСф диаметром 70 нм и 7 нс лазер [193]. Затем та же группа использовала эту систему для доставки меток в отдельные нейроны, что позволило детально изучить их морфологию [194].

Системы оптопорации клеток с использованием плазмонных НЧ (для усиления эффектов лазерного облучения (плазмонно-индуцированной оптопорации), позволяют достигать высоких показателей эффективности в широком диапазоне размеров доставляемых агентов, жизнеспособности клеток, пропускной способности (до ≈ 100000 клеток/с), могут быть совместимыми как с адгезивными, так и с суспензионными клеточными культурами. Важно отметить, возможность интеграции аппаратной части систем плазмонно-индуцированной оптопорации со световой (прямой или конфокальной) микроскопией открывает новые возможности для исследований в области для внутриклеточного биоспецифического мечения и таргетирования. Однако имеется ряд проблем, накладывающих ограничение на перенос подобных систем в область практического применения. Одна из них связана с размерным эффектом доставляемых агентов: было показано снижение эффективности доставки молекул, крупнее до 500 кДа [195], что предположительно вызвано более медленной диффузией и стерическими затруднениями при прохождении через вновь образованные мембранные отверстия. Другой проблемой является фрагментация НЧЗ за счет фотомодификации под воздействием лазерного облучения [13]. Явление фрагментации вызывает некоторую озабоченность при применении на клеточных системах *in vivo*, поскольку очень маленькие НЧЗ могут взаимодействовать с ДНК в клетках, тем самым увеличивая вероятность генотоксичности [196, 197]. Было показано, что фрагментацию частиц можно минимизировать при использовании фемтосекундного импульсного лазера на нерезонансной длине волны [9, 198] либо заменой НЧЗ на более фотостабильные, например, материалы на основе графена [186]. К сожалению,

применение фемтосекундных лазерных установок ограничено их дороговизной, а графеновые КТ [199] существенно уступают НЧЗ по фотосенсибилизирующим характеристикам и биосовместимости.

Альтернативным подходом для устранения негативных воздействий на клетки в системах плазмонно-индуцированной оптопорации, является замена суспензии НЧ на специальные *наносубстраты* с аналогичными НЧ фототермическими свойствами, являющиеся одновременно субстратами для культивирования клеток [200]. Реализация подобных систем заключается в следующем: лазерное облучение вызывает локальные повреждения мембран клеток, находящихся в непосредственной близости фототермическими элементами, обеспечивая прохождение непенетрирующих агентов во внутриклеточное пространство [8]. Один из ярких примеров таких технологий – это биофотонный хирургический инструмент с лазерной поддержкой (BLAST – от англ. «biophotonic laser-assisted surgery tool»), представляющий собой подложку с массивом микрочастиц SiO_2 , покрытых тонкими пленками титана (Ti) в форме полумесяца [201]. Одним из предположительных механизмов образования мембранных отверстий (именуемых в некоторых источниках «порами») является разрыв микрокавитационных пузырьков, способствующих эффективной доставке (до 78% кальцеин-позитивных клеток) при поддержании жизнеспособности на высоком уровне (до 87%) [202]. Другим примером является система оптопорации непрерывным лазером с длиной волны 808 нм [178], использование которой было реализовано на модели высоко эффективной доставки молекул меченых декстранов. Той же группой была изготовлена подобная платформа, НЧЗ были заменены на слои магнитных НЧ оксида железа [203]. При воздействии импульсного нс-лазера на клетки, выращенные на пирамидальных наноструктурах с золотым покрытием, наблюдалась высокая эффективность доставки широкого спектра меченых декстранов [204]. В сочетании с микрофлюидикой были изготовлены платформы с массивом золотых нанотрубок для пространственно-временного и количественного контроля внутриклеточной доставки [205]. Отверстия в клеточных мембранах

формируются горячими электронами после облучения лазером (1064 нм, 8 пс) с последующей инъекцией ПИ в микрофлюидный канал. В таблице 2 приведены обобщенные данные различных систем оптопорации для использования в трансфекции клеток.

Таким образом, платформы на основе ассемблированных НЧ имеют значительные преимущества перед системами на основе суспензионных НЧ, поскольку их использование полностью исключает прямое воздействие НЧ на клетки [178]. Этот аспект особенно привлекателен для потенциального применения в системах *in vivo*. Другое преимущество состоит в том, что в некоторых вариантах есть возможность использовать непрерывные лазеры, что представляет практический и экономический интерес, поскольку они обычно менее дорогие, чем импульсные лазеры. С другой стороны, специализированные подложки изготавливаются помощью микротехнологий [204, 201], которые могут быть труднодоступными или плохо масштабируемыми, требующими особых условий по чистоте помещений и квалификации персонала. Еще одним отмеченным недостатком является необходимость оптимизирования условий культивирования клеток на этих атипичных субстратах, многие из которых оптически непрозрачны и, следовательно, трудно совместимы с приложениями световой микроскопии.

Таблица 2 – Системы оптопорации эукариотических клеток.

Параметры лазера		НЧ/наноструктуры	Доставляемые агенты	Типы клеток	Эффективность, %	Жизнеспособность, %	Автор, год, ссылка
λ , нм	Длительность импульса						
355	нс	-	пДНК	NRK	⁵ 0,6	н.д.	Kurata S.-I., 1986, [180]
800	фс	-	пДНК	CHO, PtK2	⁵ 100	н.д.	Tirlapur U.K., 2002, [182]
532	нс	-	Тетраметилродамин-декстран, пДНК	HeLa, NIH / 3T3, 293T, HepG2, NTERA-2, PFSK-1, SU-DHL-4, CEM, 184A1, MO-2058	50	80	Clark I., 2006, [183]
800	пс	-	ПИ	Первичные астроциты крысы, PC12	⁵ 90	80	Lei M., 2008, [184]
800	фс	Луч Бесселя	ПИ	CHO-K1, HL-60	26-34	н.д.	Rendall H.A., 2012, [187]
н.д.	н.д.	Слой НЧЗ	¹ ЛПЭИ/пДНК	HeLa, HUVECs, mEF, ICR MEF,	94	40-80	Wu J., 2017, [188]
820	пс	Нанооболочки	пДНК	HN31, NOM 9	⁵ 88	н.д.	Lukianova-Hleb E.Y., 2012, [190]
слой НЧЗ	нс	НЧЗ	ПИ, ФИТЦ-декстраны	<i>In vitro</i> : HeLa, C17.2, <i>in vivo</i> : INS-1E	⁵ , ⁶ 80	80	Xiong R., 2016, [193]
561	нс	НЧЗ	Фаллоидин	WT E18 C57Bl6, Thy1-YFP (YFP +) + WT	н.д.	н.д.	Xiong R., 2018, [194]
561	нс	Графеновые КТ	ФИТЦ-декстраны	HeLa	⁵ , ⁶ 50	⁸ 70-80	Liu J., 2018, [199]
532	нс	² BLAST	Бактерии, ФИТЦ-декстраны,	HeLa, NHDF, PB-MDM, RPTEC	40–50	90	Wu Y.-C., 2015, [201]

			фермент				
1064	нс	Слои SiO ₂ -Ti	Кальцеин, ФИТЦ- декстраны,	HeLa CCL-2	⁵ 78	⁷ 87	Madrid M., 2018, [202]
808	∞	Слои НЧЗ	ТРИТЦ- декстраны, пДНК	HeLa, mEF, HUVEC	^{5,6} 80 (HeLa), ^{5,6} 53 (mEF), ^{5,6} 9 (HUVEC)	^{7,8} 80 (HeLa), ^{7,8} 95 (mEF), ^{7,8} 90 (HUVEC)	Lyu Z., 2016, [178]
808	∞	³ П-МНЧ	ТРИТЦ- декстран, пДНК+ПЭИ	HeLa	^{5,6} 67	⁷ 92	Wang L., 2018, [203]
1064	нс	Слои нанопирамид	Кальцеин, ФИТЦ- декстран	HeLa CCL-2	^{5,6} 95	⁷ 98	Saklayen N., 2017, [204]
1064	пс	⁴ ЗНТ	ПИ	NIH/3T3	^{5,6} 95	⁷ удовлетво- рительная	Messina G.C., 2015, [205]

¹ЛПЭИ – низкомолекулярный ПЭИ

²BLAST (от англ. «biophotonic laser-assisted surgery tool») – биофотонный инструмент для лазерной хирургии

³П-МНЧ – пористые магнитные НЧ оксида железа

⁴ЗНТ – золотые нанотрубки с микрофлюидным каналом

⁵Микроскопия

⁶Цитофлуориметрия

⁷Количественный подсчет клеток

⁸Тест на респираторную активность

1.4 Пути и механизмы проникновения экстраклеточных НК через естественные клеточные и тканевые барьеры

Возникающее повреждение мембраны должно быть достаточным для проникновения целевых агентов, при этом не нарушая способность клеток к самовосстановлению. Этап разрушения мембраны длится около секунды (в зависимости от конкретного метода доставки), затем молекулы диффундируют в клетку, в то время как восстановление и связанное с этим сокращение «пор» происходит от нескольких секунд до минут. За этим следует более длительная фаза, включающая восстановление цитоплазматического состава, стрессовую реакцию и возможные изменения транскрипции [206]. Приток и удержание доставляемых молекул зависит от их физико-химических свойств (размера, заряда, времени жизни) и особенностей взаимодействия с клеткой [207]. Многочисленные масштабные исследования сосредоточены на вопросах безопасности, токсичности, улучшении биораспределения и селективности доставки векторов в целевые клетки, главным образом в опухолевые, а также преодолении внеклеточных барьеров, в частности, стромального барьера опухоли [208-210], и имеют решающее значение для трансляции технологий доставки НК в применение на *in vivo* системах. Однако многие вопросы до сих пор остаются малоизученными. Например, до сих пор неизвестно, как эндосомальные фосфолипиды взаимодействуют с НК [211]. На основании знания о процессе созревания эндосом, было предположено, что отрицательно заряженный ВМР / LVPA может быть важным участником этого процесса [212]. Кроме того, до сих пор неизвестны клинически значимые механизмы транслокации ДНК в ядрах онкоклеток, независимые от митоза и плохо управляемые. Вероятно, их идентификация и использование значительно улучшат эффективность трансфекции покоящихся опухолевых клеток ДНК-содержащими невирусными наноформами [213].

Обсудим наиболее известные на сегодняшний день пути захвата чужеродных НК на примере раковых клеток и невирусных систем доставки на основе НЧ, как наиболее широко обсуждаемых в литературе модельных систем доставки.

Проникновение экстраклеточных молекулярных агентов реализуется путем различных форм эндоцитоза, включая клатрин-зависимый, кавеолозависимый, опосредованный флотилином и макропиноцитоз [214]. Как уже было отмечено, определение эндоцитарного пути зависит от конкретных параметров клеток и носителей [215]. Принято считать, что положительный заряд способствует взаимодействию НЧ с анионными гликозаминогликанами на поверхности клетки и увеличивает их поглощение [216]. Важно подчеркнуть, что все пути эндоцитоза приводят к активации эндолизосомной системы.

Интернализированные эндоцитотические везикулы (эндосомы) и их содержимое имеют несколько потенциальных мест назначения, в основном лизосомный компартмент для деградации и подавления активированных рецепторов или рециркуляции обратно на поверхность клетки после высвобождения лигандов рецепторов [217]. Фагоцитированный материал в основном направляется в поздние эндосомы и лизосомы для деградации под действием кислых гидролаз, которые в основном активны при кислом рН лизосомы (рН ~ 5) и проявляют низкую активность при рН цитоплазмы (~ 7,4) [217]. Лизосомная деградация представляет собой главный барьер для доставки в ядро чужеродных НК и других биоактивных макромолекул. Лизосомы, а также эндоплазматический ретикулум (ЭР), аппарат Гольджи и эндосомы топологически непрерывны с внешней частью клетки, т.е. выход макромолекул из любого из этих компартментов требует прохождения через липидный бислой [218]. У клетки существуют системы защиты от чужеродных НК, попавших в цитозоль, наиболее интересными из которых являются различные формы ингибирующей РНК (миРНК), нацеленной на вирусы путем последовательно специфической деградации вирусной НК [219]. Кроме того, более длинные фрагменты вирусной НК специфически активируют протеинкиназу R, что приводит к общему подавлению синтеза белка и последующей гибели клеток [220].

Ранее была выдвинута гипотеза о том, что кавеолин-опосредованный эндоцитоз может обходить деградацию НК в лизосомах [221]. Однако более позднее исследование этого типа эндоцитоза подтвердило лизосомный транспорт НК [222]. Несмотря на сходство путей переноса, специфический путь эндоцитоза влияет на

кинетику интернализации невирусных наноносителей. Исследования носителей на основе липоплексов [223] и полиплексов [224, 225], показали положительную корреляцию между скоростью интернализации и эффективностью трансфекции. В связи с этим, модификация НЧ катионными лигандами лигандным облегчает связывание полученных РНК- или ДНК-содержащих комплексов с поверхностью клетки и вызывает их быстрый рецептор-опосредованный эндоцитоз, что способствует увеличению эффективности трансфекции [226-228] по сравнению с нецелевыми аналогами. Кроме того, не исключено, что интернализация НЧ в комплексе с некоторыми из упомянутых рецепторов может снизить скорость экзоцитоза для нецелевых липидных НЧ [229] и полиплексов [230].

Помимо деталей прохождения чужеродных агентов сквозь клеточную мембрану, не менее важными вопросами являются события, происходящие в цитозольном пространстве. Сообщается, что при использовании оптопорации в качестве системы для доставки, в эндосомном высвобождении участвуют, по крайней мере, два возможных механизма в зависимости от режима ИК-излучения [231]. Как для импульсного, так и для непрерывного излучения высокой интенсивности главную роль играет тепловой механизм [231]. Локальный нагрев окружающей области вызывает повышенную подвижность и колебания эндосомальных фосфолипидов, что приводит к высокой проницаемости мембраны [82]. Однако эндосомный выход комплексов НЧЗ-НК может быть вызван низкой интенсивностью ИК-излучения. Также была обнаружена повышенная фотохимическая генерация активных форм кислорода [232], что может быть основным механизмом разрушения эндосомных пузырьков, приводящего к высвобождению комплексов НЧЗ-НК в цитозоль. Таким образом, индуцированный светом эндосомный выход НЧЗ потенциально может улучшить селективность доставки НК к локализованным опухолям.

Существует гипотеза о проникновении чужеродных НК путем пассивного захвата во время митоза, начиная с поздней профазы до поздней анафазы, когда происходит лизис кариолеммы, а ее компоненты связаны с эндоплазматическим ретикуломом [233]. Таким образом, эффективность доставки чужеродной ДНК в

делящиеся клетки будет зависеть от количества интактной ДНК, присутствующей в момент деления клетки рядом с хроматином. Эксперименты по визуализации в реальном времени, проведенные для липopleксов [234] и полиopleксов [235], показали, что экспрессия таргетного гена проявлялась в 85–90% трансфицированных клеток после прохождения митоза. В свете значительного вклада клеточного деления в трансфекцию были предложены две стратегии оптимизации поглощения ДНК ядрами дочерних клеток. Первый подход предполагал предварительную конденсацию ДНК с CdK1-чувствительным пептидом перед образованием липopleксов [236]. Была выдвинута гипотеза, что после эндосомального выхода эти пептиды остаются в цитозоле комплексе с ДНК и защищают их нуклеаз, но диссоциируют во время митоза, обеспечивая ядерный захват большего количества неповрежденной ДНК. Оказалось, что предварительная конденсация ДНК немного увеличивает эффективность трансфекции, но не имеет отношения к природе пептида, используемого для предварительной конденсации ДНК [236]. Вторая стратегия, предложенная в том же исследовании, направлена на специфическое заякоривание плазмидной ДНК на хроматине во вновь образованных ядрах за счет предварительной конденсации ДНК со специальными пептидами из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши, имеющими сродство к хроматину. Однако, несмотря на улучшение эффективности трансфекции, природа пептида, по-видимому, не является ключевым фактором [236].

Зависимая от митоза трансфекция клеток может быть значительно ограничена в клеточных линиях с нечастым делением клеток. Примечательно, что даже без сигналов ядерной локализации и других нацеленных на ядро последовательностей ДНК с липopleксом или полиopleксом может достигать ядра независимо от митоза, согласно данным микроскопии живых клеток [235, 234]. Некоторые данные, подтверждающие это открытие, были ранее получены дополнительными косвенными методами, включая проточную цитометрию [237-239]. Механизмы, лежащие в основе доставки невирусных генов, не зависящей от митоза, до сих пор неизвестны. В случае полиopleксов они в основном объясняются способностью поликатионов проникать в ядерную оболочку [240, 241], тогда как независимое от

митоза проникновение в ядро липоплекс-сформулированной ДНК, как полагают, происходит посредством прямого слияние липоплекс-содержащих эндосом с ядерной мембраной [241]. Однако прямых экспериментальных доказательств упомянутых механизмов пока нет.

1.5 Постановка задач исследования

Таким образом, несмотря на большое количество исследований в области разработки новых инструментов и материалов для эффективной внутриклеточной доставки терапевтических агентов, в частности НК, до сих пор не существует единой универсальной технологии, предназначенной для работы с клетками про- и эукариот. Очевидно, что свободному проникновению векторов препятствуют естественные клеточные и тканевые барьеры. Совокупностью обозначенных проблем обусловлена актуальность настоящей работы в фундаментальном и прикладном аспектах.

Исследования посвящены разработке и детальному изучению, оптимизации и адаптации для различных типов клеток новой системы плазмонно-индуцированной оптопорации на платформах слоев НЧЗ. К моменту начала исследований по теме диссертации, имелся ряд нерешенных вопросов, связанных с разработкой простых и удобных платформ ассемблированных НЧЗ для оптопорации, с минимизацией негативных эффектов непрерывного лазера, ограничивающих его применение для плазмонной оптопорации клеток. Наконец, малоизученными и важными являются вопросы, связанные с реакциями живых клеток на лазерное облучение и механизмами его воздействия. В круг решаемых практически значимых вопросов будут входить исследования возможности точечной настройки параметров платформ слоев НЧЗ, режимов световой волны и сканирования объекта импульсным лазером под конкретные особенности клеток, для создания условий контролируемой оптопорации, позволяющей производить прецизионную трансфекцию вплоть до уровня единичных клеток.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: золотохлористоводородная кислота HAuCl_4 (ABCR), цетилтриметиламмоний бромид $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ (ЦТАБ) (Fluka, 96%), абсолютный этанол $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (Scharlau Chemie, ET0016, 99,99%), соляная кислота HCl (Вектон), тиолированный полиэтиленгликоль (ПЭГ) (Creative PEGWorks, Mw 5000), бактотриптон (BD), канамицин (Биохимик, 99%). Поли-4-винилпиридин (ПВП), поливинилпирролидон (Mw 29000), боргидрид натрия NaBH_4 , олеат натрия NaOL (86%), дигидрат тринатрийцитрата $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (99%), L(+)-аскорбиновая кислота $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (AA), нитрат серебра AgNO_3 , смесь антибиотиков пенициллин-стрептомицин-неомицин, трипсин, 4,6-диамидино-2-фенилиндол $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$ (DAPI), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ), резазурина натриевая соль $\text{C}_{17}\text{H}_6\text{NNaO}_4$, ампициллин $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (100%), были взяты в Sigma-Aldrich с самой высокой степенью чистоты. Дрожжевой экстракт, агар-агар, 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ (MES), DL-дитиотреитол $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (ДТТ), Трис $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (ЭДТА), борная кислота HBO_3 , агароза LE-2 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9$ (биотехнологический класс), бромид этидия (EtBr) $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ были взяты в компании Helicon. Маркеры длин фрагментов ДНК MassRuler, буфер для внесения образцов в гель, Taq ДНК-полимераза, наборы рестриктаз EcoR1 и BamH1, смесь дезоксирибонуклеотидов (dNTP), набор для препаративного выделения плазмидной ДНК GeneJET Plasmid Midiprep Kit, реагенты для трансфекции Турбофект (ТФ) и Липофектамин2000 (ЛФ) были приобретены в компании Fermentas, ThermoFisher Scientific. Набор для выделения геномной ДНК QIAamp DNA Mini Kit был произведен в Qiagen. Селективный антибиотик генетицин дисульфатная соль (G418), был приобретен в Capricorn. Питательная среда DMEM, сыворотка крови плодов коровы (FBS, 10%), раствор

Версена, таблетки фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4 0,01M) были приобретены в компании Биолот. Гидроксид натрия NaOH, хлорид магния MgCl₂ (99%), сульфат магния MgSO₄ (99,79%), глюкоза C₂H₁₂O₆ (99%), хлорид калия KCl (99%) были приобретены в Диа-М. Хлорид натрия NaCl (ч.д.а.), кальций хлористый двухводный CaCl₂*2 H₂ (ч.д.а), гидроксид калия KOH (ч.д.а.), ацетат калия C₂H₃KO₂ (ч.д.а.) были приобретены в ЭКРОС. N,N-диметилформамид C₃H₇NO (ДМФ), диэтиламин C₄H₁₁N были приобретены в компании AppliChem. Флуоресцеин диацетат C₁₀H₁₂N₄O₅ (ФДА) и анти-фэйдинговый реагент SlowFade® Gold были приобретены в Invitrogen. Карбонат калия K₂CO₃ и диметилсульфоксид C₂H₆OS (ДМСО) (класс ACS) были приобретены в Реахим. Во всех экспериментах использовали деионизованную воду, полученную системой Milli-Q Integral 5 (Millipore) с предварительной очисткой фильтрующей системой Медиана-Фильтр (Медиана).

2.2 Материалы

Непенетрирующие флуоресцентные молекулярные агенты:

В работе использованы флуоресцирующий краситель ПИ (Sigma #P4170, мол. масса 670 Да, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=493/636$ нм) и набор меченых производных декстранов различной мол. массы (ФИТЦ-декстраны (Invitrogen): #BCBV4765, 3-5 кДа, #SLBN7802V, 10 кДа, #SLBN7796V, 40 кДа; ТРИТЦ-декстран Sigma #42874, 40 кДа).

Плазмиды

В работе использованы коммерческие векторы на основе плазмидных ДНК, несущих гены флуоресцентных белков с эмиссией в широком спектральном диапазоне, экспрессирующихся в клетках млекопитающих, под контролем CMV-промотора. Все векторы снабжены кассетами с генами антибиотикоустойчивости (к неомицину) для проведения селективного отбора в клетках эукариот. Кроме того, содержат дополнительный промотор SV40 и специфические кассеты

антибиотикоустойчивости (см. ниже) для клонирования и отбора в прокариотических клетках. Копийность в клетках бактерий составляет 10-50 копий/клетку. Ниже приведены индивидуальные характеристики векторов.

pCMV-GLuc-2 (# N8081, BioLabs), далее по тексту обозначенная как *nGLuc*. Размер генома составляет 5802 п.н. (молекулярная масса ~1.8 МДа). Содержит ген-предшественник фермента люциферазы (GLuc), продуцируемой экстраклеточно. При взаимодействии с субстратом (люциферин) образует люминесцирующий продукт ($\lambda_{em}=475$ нм). Имеет кассету устойчивости к ампициллину.

pMGFP (#ТВ320, Promega), далее по тексту обозначенная как *nGFP*. Размер генома составляет 4707 п.н. (молекулярная масса ~ 1.4 МДа). Содержит ген, кодирующий зеленый флуоресцирующий белок (GFP, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=488/520$ нм) с экспрессией в цитозоле, и кассету устойчивости к ампициллину.

pRabCherry (#27679, Addgene), далее по тексту обозначенная как *nRFP*. Размер генома составляет 4722 п.н. (молекулярная масса ~ 1.4 МДа). Содержит ген, кодирующий красный флуоресцирующий белок (mCherry, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=530/650$ нм) с экспрессией в цитозоле, и кассету устойчивости к канамицину.

Бактериальные культуры

В работе использован дефектный по эндонуклеазе (*endA*) штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (№ 632), который был приобретен из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Культуры животных клеток

В работе использованы постоянные клетки карциномы шейки матки человека HeLa, клетки эпидермальной карциномы человека A431, фибробластоподобные клетки почки африканской зеленой мартышки Vero, эпителиальные клетки яичника китайского хомячка CHO и клетки эмбриональной почки человека НЕК 293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

2.3 Оборудование

Источники лазерного облучения

В качестве источника импульсного облучения использовали коммерческую установку LSF-20H (Мора, HG-Tech, Китай) с длиной волны 1064 нм, номинальной мощностью 20 Вт, с перенастраиваемым наносекундным иттербиевым лазером с узкофокусированным пучком (диаметр пятна в перетяжке 3 мкм) и автоматизированной подвижкой по осям X-Y-Z. В качестве непрерывного источника лазерного облучения использовали лазер с длиной волны 808 нм (Optronics, Россия), номинальной мощностью 4 Вт и сильно расфокусированным пучком.

Микроскопическое оборудование

Прижизненную микроскопию животных клеток проводили на инвертированном микроскопе DMI3000 с объективами 5x, 10x, 20x, снабженного высокочувствительной CCD-камерой 420 D (Leica Microsystems, Германия) для захвата изображений в режимах светлого поля и флуоресценции с использованием светофильтров I3, N21, D. Флуоресцентные изображения препаратов трансфицированных клеток получали *ex vitro* на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе TCS SP8 X с объективом 40x (Leica Microsystems, Германия) на базе Саратовского госуниверситета (СГУ, г. Саратов, Россия). Электронно-микроскопические (ЭМ) изображения были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) Libra-120 (Carl Zeiss, Йена, Германия) при 120 кВ в Центре коллективного использования исследовательского оборудования Симбиоз в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии ИБФРМ РАН. ЭМ-изображения слоев НЧЗ, приготовленных на кремниевых пластинах (вейферах), получали с помощью сканирующего электронного микроскопа MiraTescan (Tescan, США) при 30 кВ на базе СГУ. Топография слоев НЧЗ, механические свойства клеток были исследованы на атомно-силовом микроскопе (АСМ) BioScope Resolve (Bruker,

США), совмещенном с инвертированным флуоресцентным микроскопом Axio Observer (Carl Zeiss, Германия), с использованием набора кантилеверов с различными размерами острия и номинальной жесткости, на базе Института регенеративной медицины Сеченовского университета (Москва, Россия).

Оптические анализаторы

Спектрофотометрические измерения проводили на UV-vis спектрофотометрах Specord BS-250UV-Vis, S-300Vis, S-600UV-Vis (Analytik Jena, Германия). Гидродинамический размер НЧЗ и величину их дзета-потенциала измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Микропланшетный ридер Spark 10M (Tecan, Австрия) использовали для получения спектрофотометрических характеристик слоев НЧЗ, для колориметрического определения жизнеспособности клеток (МТТ-тест).

Оборудование для культивирования и анализа клеток

Клетки культивировались в термостатируемый CO₂ инкубатор Innova CO-14 (New Brunswick Scientific, Германия). Подсчет клеток осуществляли на автоматическом счетчике TC20 (BioRad, США). Флуориметрические измерения проводили на микропланшетном ридере Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Количественный учет эффективности трансфекции осуществляли методом Проточной цитофлуориметрии на цитометре Amnis® Imaging Instrument Comparison (Luminex, США) на базе Саратовского госуниверситета.

Молекулярно-биологическое оборудование

ПЦР-амплификацию осуществляли на термоциклере T-100 (Bio-Rad, США) с последующим разделением продуктов методом горизонтального гель-электрофореза в камере SE 1 с источником питания Эльф-4 (Хеликон, Россия) и детекцией на 312/365 нм УФ-трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция).

Общелабораторное оборудование

Комплект напольных (5804, охлаждаемая 5810R, оснащенная бакет-ротором для центрифугирования (ЦФ) планшетов S-4-104) и настольных мини-центрифуг Minispin (Eppendorf, Германия). Система очистки воды Milli-Q Academic (Millipore, Франция), установка для получения деионизованной воды УВОИ-МФ-1812-С6-1 (Медиана-Фильтр, Россия), микропланшетный спектрофотометр Multiskan Ascent+ (Thermo Fisher Scientific, США), ультразвуковая баня УЗУМИ-05 (Трима, Россия), магнитная мешалка Heidolph MR 3001 (Heidolph, Германия), шейкер термостатированный (BioSan, Латвия), цифровой фотоаппарат Canon 350D (Canon, Япония), набор механических дозаторов переменного объема (Eppendorf, Германия).

2.4 Методы

В работе использованы следующие общепринятые методы: спектроскопические (UV-vis спектроскопия, спектрофлуориметрия, метод ДРС); микроскопические (АСМ, ПЭМ, СЭМ, фазово-контрастная, флуоресцентная и лазерная конфокальная микроскопия); поддержания, культивирования и криоконсервации клеток млекопитающих и бактерий; проточной цитофлуориметрии; колориметрического определения дыхательной активности клеток (цитотоксические тесты); селективного отбора трансфицированных клеток и получения линии со стабильной экспрессией генов флуоресцирующего белка; полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализа); молекулярного клонирования в клетках *E. coli* и препаративной наработки плазмидных ДНК.

Отдельно следует упомянуть оригинальные методические подходы, определяющие новизну и научно-практическую значимость настоящей работы: модифицированные протоколы синтеза, функционализации поверхности биоспецифическими лигандами и характеристики образцов НЧЗ с различными физико-химическими параметрами; разработанные и оптимизированные

подходы получения и характеристики слоев НЧЗ на дне лунок культурального пластика, облучения клеток на платформах слоев НЧЗ.

2.4.1 Синтез, функционализация и характеристика НЧЗ

Приготовление золей НЧЗ осуществлялось методами жидкофазной химии с использованием традиционных подходов с оригинальными модификациями, разработанными ранее в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН. Для удобства изложения материала будут использоваться сокращенные названия образцов НЧЗ, обозначающие их тип и положение максимума ПР, например, ЗНЗ-800 – золотые нанозвезды с ПР в области 800 нм. Для приготовления водных растворов на всех стадиях использовали деионизованную воду (MilliQ). Синтез осуществляли в термостойкой стеклянной посуде, тщательно отмытой царской водкой (смесь концентрированной азотной и соляной кислот в объемном соотношении 1:3).

Синтез НСф

НСф со средним диаметром около 16 нм были получены восстановлением HAuCl_4 цитратом натрия, как описано в Grabar et al. [242]. К 250 мл 1 мМ кипящего водного раствора HAuCl_4 быстро добавляли 25 мл 38,8 мМ водного раствора цитрата натрия, что приводило к изменению цвета раствора от бледно-желтого до темно-красного.

Синтез ЗНЗ с ПР в области 800 нм

ЗНЗ-800 были изготовлены с помощью двухстадийного зародышевого способа, предложенного Yuan et al. [243], с небольшими модификациями [244]. К 50 мл 0,75 мМ раствора HAuCl_4 последовательно добавляли при постоянном перемешивании (450 об/мин) на магнитной мешалке без нагревания следующие растворы: 1,5 мл свежеприготовленного 16-нм раствора НСф, как описано выше [242], используемого в качестве зародышей; 150 мкл 1 М HCl ; 1,5 мл 2 мМ

AgNO₃. Затем добавили 750 мкл 100 мМ раствора аскорбиновой кислоты и остановили перемешивание через 30 с, наблюдая за изменением цвета коллоида от светло-красного до серовато-голубого.

Синтез ЗНЗ с ПР в области 1000 нм

Образцы ЗНЗ-1000 синтезировали в органической фазе по представленному в [245] протоколу. Заранее готовили раствор 0,25 М H₂AuCl₄ в ДМФ и выдерживали в течение одной недели перед синтезом. Синтез проводили на магнитной мешалке при постоянном перемешивании: сначала последовательно смешали при комнатной температуре 8,4 мл ДМФ, 400 мкл 5% раствора поливинилпирролидона (мол. масса 29000) в ДМФ, 80 мкл диэтиламина и 35 мкл 0,25 М раствора H₂AuCl₄ в ДМФ. Через 5 мин доводили температуру до 100 °С и перемешивали еще 10 мин. Затем полученный раствор охлаждали до комнатной температуры, ЦФ при 9000 об/мин 10 мин и растворяли в 6 мл воды.

Синтез НСт с ПР в области 800 нм

Наностержни (НСт-800) были изготовлены с помощью двухстадийного зародышевого метода, предложенного в [246], с нашими небольшими модификациями [247]. Вкратце, зародышевый раствор получали путем смешивания водных растворов: 10 мл 100 мМ ЦТАБ и 250 мкл 10 мМ H₂AuCl₄ с последующим добавлением 1 мл свежеприготовленного ледяного раствора 10 мМ NaBH₄. Раствор оставляли открытым для созревания зародышей в течение 2 ч при комнатной температуре. Для синтеза НСт готовили ростовой раствор, содержащий 900 мл 100 мМ ЦТАБ, 50 мл 10 мМ H₂AuCl₄, 20 мл 4 мМ AgNO₃, 10 мл 100 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мл 1 Н HCl, к нему добавляли 10 мл зародышевого раствора. Смесь инкубировали в течение 48 ч при 30 °С, при этом бесцветная прозрачная суспензия постепенно приобретала бордово-коричневый цвет. Затем освобождали от ростового раствора двукратным ЦФ при 9000 об/мин в течение 60 мин и ресуспендированием в воде.

Синтез НСт с ПР в области 1000 нм

Наностержни (НСт-1000) были изготовлены с помощью двухстадийного зародышевого метода на мицеллярных матрицах смеси двух ПАВ, предложенного в [248], с нашими небольшими модификациями [249]. Комбинированный раствор ПАВ готовили в 250 мл теплой воды (~ 50 °С) растворением ЦТАБ и олеата Na до достижения финальной концентрации 37 мМ и 47 мМ, соответственно. Затем раствор охлаждали до 30 °С и добавляли 18 мл 4 мМ раствора AgNO_3 , через 30 мин добавляли 250 мл 1 мМ раствора HAuCl_4 и перемешивали при 700 об/мин в течение 90 мин при 30 °С. Раствор при этом становился прозрачным. Далее вводили 2,1 мл 12,1 М HCl и перемешивали в течение 15 мин при 400 об/мин. Затем добавляли аскорбиновую кислоту до финальной концентрации 64 мМ, энергично перемешивали в течение 30 с, добавляли 800 мкл раствора зародышей (приготовленных аналогичным образом, как для синтеза НСт-800, см. выше) через 30 с останавливали перемешивание и инкубировали в течение 12 ч при 30 °С. Затем освобождали от ростового раствора двукратным ЦФ при 9000 об/мин в течение 30 мин и ресуспендированием в воде.

Пегилирование НЧЗ

Дважды отмытые от ростового раствора образцы ЗНЗ-1000, НСт-800 и НСт-1000 титровали раствором 200 мМ K_2CO_3 до 9 pH с последующим добавлением раствора тиолированного ПЭГ до финальной концентрации 10 нМ и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Для удаления неспецифически связанных молекул ПЭГ образцы дважды ЦФ при описанных выше оборотах для каждого типа частиц и диспергировали в воде.

Характеристика

Традиционный набор характеристик свежесинтезированных образцов НЧЗ получали методами UV-vis спектроскопии (спектр экстинкции, величина и положение максимума ПР); ДРС (средний гидродинамический диаметр частиц,

распределение частиц по размерам, величина и знак дзета-потенциала); ПЭМ – изображения частиц (геометрические параметры НЧЗ).

2.4.2 Приготовление и характеристика слоев НЧЗ

Слои НЧЗ были приготовлены на дне лунок пластиковых культуральных планшетов (96, 24, 12, и 6 луночных (Corning Costar, GEB)). В каждую лунку вносили 1% спиртовой раствор ПВП (объем раствора варьировал в зависимости от площади лунки) таким образом, чтобы раствор полностью покрывал дно, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Затем лунки несколько раз промывали этанолом и водой Milli-Q, и вносили свежеприготовленные коллоиды НЧЗ (ЗНЗ-800, НСф) или пегилированных НЧЗ (ЗНЗ-1000, НСт-800 и НСт-1000) в ряду концентрационных разведений для достижения заданных значений поверхностного содержания Au (от 4 мкг/см² до 35 мкг/см²). Затем планшеты помещали в бакет-ротатор центрифуги Eppendorf 5810R и ЦФ при следующих режимах: 5 мин при 1000 g для ЗНЗ-800 и для ЗНЗ-1000; 20 мин при 2000 g для НСт-800; 10 мин при 1000 g для НСт-1000; 30 мин при 2000 g для НСф-520. Супернатант удаляли, лунки промывали водой и сушили на воздухе. Перед культивированием клеток полученные планшеты со слоями НЧЗ один раз промывали дистиллированной водой. Затем обрабатывали в 96% этаноле в течение 30 мин с последующей обработки ультрафиолетом в течение 15 мин и хранили при 4 °С для дальнейшего использования.

Характеристика слоев НЧЗ

Спектры экстинкции свежеприготовленных слоев НЧЗ, супернатантов после ЦФ планшетов, измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Spark 10M. Равномерность покрытия была оценена путем измерения оптической плотности лунок в режиме 2-D сканирования на фиксированной длине волны, соответствующей максимуму ПР для каждой лунки. Слои НЧЗ для СЭМ были подготовлены на специальных подложках (вейферах) по вышеописанной

методике: в лунки 12-луночных планшетов помещали предварительно обработанные раствором «пиранья» (смесь концентрированной серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 4:1, соответственно) и отмытые водой кремниевые подложки (вейферы) размером 1x1 см; затем лунки (вместе с подложками) обрабатывали ПВП и добавляли коллоиды НЧЗ. Далее культуральные планшеты ЦФ вместе с подложками, промывали и высушивали. Затем образцы визуализировали без дополнительного напыления при напряжении 30 кВ. Для визуализации топографии слоев НЧЗ методом высокоразрешающей АСМ-микроскопии получали слои НЧЗ на дне полистироловых чашек Петри (диаметром 35 мм, Corning Costar). Сканирование проводилось на воздухе в режиме Peak-Force Trapping, с использованием кантилевера ScanAsyst-Air с номинальным радиусом острия 2 нм.

2.4.3 Нарботка препаратов плазмидной ДНК методом молекулярного клонирования

Культивирование бактерий *E. coli*, приготовление компетентных клеток и трансформацию ДНК-плазмидами (по механизму теплового шока) осуществляли по общепринятым методикам [250]. Отбор трансформантов и дальнейшее поддержание клонов производили на твердой селективной среде LB (Lisogenic Broth), содержащей 100 мкг/мл антибиотика. Затем отобранные колонии пересевали на жидкую селективную среду, и экстрагировали плазмидную ДНК (пДНК) коммерческим набором GeneJET Plasmid Midiprep Kit THERMO согласно рекомендациям производителя. Выделенная пДНК либо использовалась сразу, либо хранилась при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Характеристика препаратов плазмид

Чистоту препаратов и их концентрацию определяли путем измерения оптической плотности на длинах волн 230/260/280 нм. Для получения плазмидного профиля проводили рестрикционный анализ с использованием

коммерческих ферментов EcoR1 и BamH1 согласно инструкциям производителя. В реакционную смесь вносили 1 мкг пДНК, 1 мкл рестриктазы в специальном буфере и доводили общий объем смеси до 25 мкл водой Milli-Q. Реакционные пробирки инкубировали в течение 2-5 ч при температуре 37 °С, затем ингибировали реакцию путем добавления 4 мкл глицерин-содержащего буфера для внесения в гель в каждую пробирку. Продукты рестрикции подвергали электрофоретическому разделению в 1%-агарозном геле, приготовленном на 1X TBE-буфере (54 г Tris, 27,5 г борной кислоты, 146 г ЭДТА в 1 л дистиллированной воды), с добавлением 0,5 мкг/мл EtBr. Электрофорез проводили в течение 40-50 мин при напряженности поля 6 Вт/см.

2.4.4 Культивирование клеток и подготовка к оптопорации

Используемые в работе клетки постоянно поддерживали в культуральных флаконах на среде ДМЕМ, содержащей 10% сыворотки плодов коровы и 100 мкг/мл смеси антибиотиков (пенициллин-стрептомицин-неомицин), при 37 °С в присутствии 5% CO₂. Смену питательной среды производили каждые 3-5 дней, клетки пассировали при достижении 80-90% конфлюэнтности монослоя, для экспериментов брали клетки, начиная со 2 пассажа после разморозки, и не старше 10 пассажа. За 24-48 ч до начала оптопорации клетки трипсинизировали и пересаживали в стерилизованные планшеты со слоями НЧЗ. Расчет посевной дозы осуществлялся в зависимости от площади лунки (от 2×10³ до 80×10⁴ клеток на лунку) на автоматическом счетчике клеток.

2.4.5 Оптопорация клеток на слоях НЧЗ

Эксперименты проводили при достижении ~70%-ной конфлюэнтности монослоя клеток. Отрицательным контролем во всех экспериментах служили образцы клеток, выращенные в лунках без слоев НЧЗ и не подвергавшиеся лазерному воздействию. Положительным контролем в экспериментах по доставке

пДНК служили коммерческие химические агенты ТФ и ЛФ, трансфекцию производили согласно рекомендациям производителя [251]. Общая схема типичного эксперимента выглядит следующим образом. Непосредственно перед облучением культуральную среду удаляли, промывали однократно ФСБ, вносили эквивалентное количество бессывороточной среды ДМЕМ, и раствор доставляемых агентов (ПИ с финальной концентрацией 15 мкМ, 500 нг/мл пДНК, ФИТЦ-меченых декстранов с финальной концентрацией 100 мкМ), и помещали планшеты в СО₂ инкубатор на 15 мин. Далее лунки подвергали однократному лазерному облучению. Оптимальные параметры лазерного излучения определялись индивидуально для слоев каждого типа НЧЗ (см. ниже, гл. 4). Сразу после облучения планшеты инкубировали 30 мин (в экспериментах с ПИ и ФИТЦ-декстранами), либо 6 ч (в экспериментах с пДНК) в СО₂ инкубаторе. Затем избыток молекул доставляемых агентов удаляли однократным промыванием ФСБ, среду в лунках меняли на полную ДМЕМ. Клетки культивировали в течение 24-72 ч для оценки эффективности и определения параметров жизнеспособности.

Оптимизация режимов лазерного облучения на модельном объекте ПИ

Пошаговую оптимизацию параметров слоев НЧЗ (ЗНЗ-800, ЗНЗ-1000, НСт-800 и НСт-1000 с варьирующей содержанием Au от 4 до 37 мкг/см²) и режимов облучения проводили на модельном красителе ПИ при прочих неизменных. Диапазоны параметров облучения непрерывным лазером: длительность 20–200 с, энергия 25 Дж, общая температура внутри лунки 37–55 °С, площадь единичной поверхности (0.28–10 см²). Через 30-60 мин после облучения подсчитывали эффективность оптопорации, через 24 ч оценивали жизнеспособность клеток. Диапазоны параметров облучения импульсным лазером: мощность 11–38% (относительно номинальной 20 Вт), что соответствует энергии импульса 0.9–3 мкДж; длительность импульса 100–200 нс; скважность импульса 10–25 кГц; площадь единичной поверхности (0.28–10 см²); скорость 2-D сканирования 25–50 мм/с. (см. п. 2.4.6, 2.4.7).

2.4.6 Оценка эффективности оптопорации клеток

Флуоресцентная микроскопия

Прямую флуоресцентную микроскопию использовали только для оценки эффективности доставки ПИ в клетки. Относительное количество ПИ⁺ клеток после облучения (образец), нормированное на среднее число клеток в монослое (без воздействия, контроль), определяли путем обработки флуоресцентно-микроскопических изображений. Для учета было взято не менее 1000 клеток с каждого образца.

Проточная цитофлуориметрия

Цитофлуориметрический анализ использовали для оценки эффективности внутриклеточной доставки *nGFP* и *nGluc* плазмид. Экспериментальные наборы включали все варианты опытных и контрольных лунок. Процедура пробоподготовки включала следующие этапы: трипсинизация клеток через 72 ч после трансфекции; трехкратное ЦФ и диспергирование осадка в эквивалентном количестве ФСБ; концентрирование клеточного осадка после третьей отмывки в 30 мкл специального ФСБ, не содержащего ионы кальция и магния (для максимальной дезагрегации клеток). Далее образцы подвергали цитофлуориметрическому анализу при следующих режимах: $\lambda_{ex}/\Delta\lambda_{em} = 488/500-560$ нм, при мощности возбуждающего лазера 200 мВт. Анализу подвергалось не менее 4 выборок каждого из образцов. В одну выборку включалось около 4 тысяч объектов.

Оценка люциферазной активности

Люциферазный тест использовали для оценки эффективности внутриклеточной доставки *nGluc* плазмиды. Из экспериментальных лунок отбирали культуральную среду объемом не менее 200 мкл в отдельные пробирки для анализа через равные промежутки времени после трансфекции (48, 72 и 96 ч). Люминесцентную реакцию инициировали смешиванием 10 мкл образцов с 50

мкл коммерческого раствора люциферина в специальном буфере (прилагаются к набору) в 96-луночных микропланшетах с изолированными лунками темного цвета. Интенсивность люминесценции регистрировали при полностью закрытом возбуждающем канале, $\lambda_{em}=475$ нм, время интегрирования составляло 5 с.

Лазерная сканирующая (конфокальная) микроскопия была применена для оценки эффективности доставки плазмид *nGluc*, *nGFP* и *nRFP* в клетки. Пробоподготовку к конфокальной микроскопии осуществляли по общепринятой методике [252] следующим образом: фиксация клеток, выращенных на покровных стеклах, 3,6% раствором формалина; пятикратное промывание раствором ФСБ; окрашивание ядер клеток флуоресцентным красителем DAPI (100 нг/мл); трехкратное промывание раствором ФСБ; перенос покровного стекла (клетками вниз) на предметное стекло с добавлением антифейдингового реагента. Относительное количество ПИ⁺ клеток после облучения (образец), нормированное на среднее число клеток в монослое (без воздействия, контроль), определялось путем обработки флуоресцентно-микроскопических изображений. Для учета было взято не менее 1000 клеток с каждого образца.

2.4.7 Оценка жизнеспособности клеток

Количественная оценка жизнеспособности клеток HeLa, выращенных на слоях ЗНЗ, а также воздействия лазерного облучения при оптопорации, была произведена общепринятыми тестами на дыхательную активность клеток. Прямая микроскопия и стандартное окрашивание на живые и мертвые клетки с использованием смеси красителей ПИ/ФДА (ФДА – флуоресцеин диацетат) [253] были использованы для визуальной оценки состояния клеточного монослоя на всех стадиях эксперимента.

MTT-тест проводили в соответствии с общепринятым протоколом [254] с незначительными модификациями. Клеточную среду во всех лунках удаляли и заменяли на 100 мкл раствора МТТ (5 мг/мл). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в присутствии 5% CO₂. Затем жидкость отбирали, в каждую лунку добавляли 100 мкл ДМСО и инкубировали планшеты в течение 15 мин при 37 °С для ресуспендирования осадка формазана. Далее регистрировали поглощение на микропланшетном ридере на длине волны $\lambda_{\text{abs}}=490$ нм. Данные оптической плотности образцов, нормализованные на значения отрицательного контроля (необлученных клеток, выращенных без слоев НЧЗ), отображали относительную дыхательную активность клеток.

Резазурин-тест проводили с использованием коммерческого реагента Alamar blue в соответствии с рекомендациями производителя [255]. Клеточную среду заменяли на рабочий раствор резазурина (50 мкг на 1 мл среды для культивирования клеток). Планшеты инкубировали в течение 3, 5, 24, 48 и 72 ч при 37 °С в присутствии 5% CO₂. В указанные промежутки времени отбирали по 100 мкл надосадочной жидкости из всех вариантов опытных и контрольных лунок. Флуориметрические измерения проводили на микропланшетном ридере Cary Eclipse при следующих параметрах: длина волны возбуждения – 530 нм, длина волны эмиссии – 600 нм, ширина щели – 10 нм, время интегрирования – среднее. Значения интенсивности флуоресценции в экспериментальных и контрольных лунках нормировались на отрицательный контроль (раствор резазурина в питательной среде).

2.4.8 Оптотрансфекция клеток HeLa для получения клонов со стабильной экспрессией флуоресцирующих белков

Получение модифицированных клеток линии HeLa со стабильной экспрессией внутриклеточного белка mCherry, и экстраклеточной люциферазы проводили по стандартному протоколу [256]. Доставку плазмид *nRFP* и *nGLuc*

осуществляли оптотрансфекцией клеток на слоях НЧЗ в оптимизированных условиях, в качестве положительного контроля были взяты клетки, трансфицированные с помощью ТФ. На начальном этапе была определена полублетальная доза селективного антибиотика G418 путем культивирования клеток HeLa на питательной среде ДМЕМ с добавлением раствора генетицина в диапазоне концентраций от 0 до 1400 мкг/мл [256]. Начиная с 96 ч после трансфекции, клетки культивировались на селективной среде с LC₅₀ содержанием G418. Отбор антибиотикорезистентных клеток проводили на селективной среде в течение 3-4 недель, до полного формирования монослоя флуоресцирующих клеток с нормальной морфологией. Полученные модифицированные клетки HeLa-mCherry⁺ и HeLa-Gluc⁺ криоконсервировали и помещали в жидкий азот на длительное хранение, через 3 месяца размораживали, оценивали морфологические параметры формирования монослоя клеток, и детектировали флуоресценцию mCherry.

ПЦР-анализ на наличие инсерции фрагмента pGLuc в трансфицированных клетках HeLa

Трансфицированные клетки, культивируемые в течение 10-14 дней на селективной среде с генетицином, трипсинизировали и выделяли общую ДНК с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit согласно инструкции производителя. ПЦР-амплификацию проводили использованием рекомендуемых производителем пДНК олигонуклеотидных праймеров, комплементарных фланкирующим участкам гена люциферазы. Последовательности прямого праймера 5'-GCCAGCAAGATCCAGGGCCA-3', обратного 5'-TCAGGGCAAACAGAACTTTGACT-3'. В качестве матриц для ПЦР были взяты: общая ДНК трансфицированных оптотрансфекцией на слоях НЧЗ (образец); общая ДНК трансфицированных ТФ (положительный контроль); очищенная пДНК (внутренний контроль системы); ДНК из нетрансфицированных клеток, очищенная от нуклеаз вода Milli-Q (отрицательный контроль). Все ПЦР проводили в 200 мкл тонкостенных пробирках (Scientific Specialties, Inc., США)

в термоциклере T-100 (Bio-Rad, США). Состав амплификационной смеси: 3 мкл 10 × ПЦР-буфера, 10 мМ dNTP, 25 мМ MgCl₂, 5 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы, 50 пмоль каждого праймера и 2 мкл ДНК-матрицы, вода Milli-Q переменного объема до доведения общего объема смеси 30 мкл. Режимы амплификации: 5 мин предварительной денатурации при 94 °С; 35 циклов, включающих 30 с денатурацию при 94 °С, 30 с отжиг праймеров при 52 °С и 30 с элонгацию при 72 °С; 10-мин финальная элонгация 72 °С. После завершения амплификации ПЦР-продукты, детектировали методом горизонтального агарозного гель-электрофореза с использованием интеркалирующего красителя бромистого этидия при следующих условиях: 1.5% агарозный гель, 1xTBE буфер, напряжение 127 В, сила тока 57 мА, 60 мин.

2.4.9 Изучение механических свойств оптопорированных клеток HeLa методом АСМ

Прижизненная АСМ-микроскопия образцов клеток HeLa, выращенных в 35-мм чашках Петри на слоях НЧЗ, осуществлялась на термостатируемом предметном столике при постоянно поддерживаемой температуре на уровне 37 °С. Были взяты короткие лопаточные кантилеверы PeakForce QNM-Live Cell (PFQNM-LC-A-CAL, Bruker AFM Probes, Камарилло, Калифорния, США), с предварительно откалиброванной жесткостью пружины (значения находились в диапазоне 0,06-0,08 Н/м) и острием радиусом 70 нм и длиной 17 мкм. Чувствительность к отклонению кантилевера (нм/В) была откалибрована по тепловому спектру непосредственно в чашке Петри с образцом с использованием предварительно откалиброванного значения жесткости пружины [257, 258]. Наномеханические карты были получены в режиме быстрого измерения с типичным размером карты 80 x 80 мкм с разрешением от 32 x 32 до 80 x 80 dpi. Было использовано вертикальное линейное расстояние 3 мм, вертикальная пьезоскорость 183 мм/с и усилие срабатывания 0,5–1 нН, что привело к глубине вдавливания 400–900 нм. Обработка силовой кривой

производилась по разработанной сотрудниками Сеченовского института регенеративной медицины методике [258, 259]. Силовые кривые были скорректированы с учетом гидродинамического сопротивления и был определен уровень нулевой силы. Затем был рассчитан кажущийся упругий модуль Юнга (E , МЮ, формула 1) путем аппроксимации силовых кривых с помощью модели Герца с поправкой на эффект дна [260]:

$$F = f_{BEC}(\delta) \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} \delta^{3/2}, \quad (1)$$

где F – измеренная сила, δ – глубина вдавливания, R – радиус острия, ν – коэффициент Пуассона образца (считался равным 0,5 для клеток), а $f_{BEC}(\delta)$ – коэффициент коррекции эффекта дна [260].

Измерения АСМ проводили в бессывороточной среде ДМЕМ с 25 мМ NERES, облучение проводили в той же среде. После и между АСМ-измерениями среду меняли на полную среду ДМЕМ с сывороткой для ускорения восстановления клеток.

2.4.10 Статистическая обработка экспериментальных данных

Подсчет ПИ⁺-клеток на флуоресцентных микрофотографиях производили с использованием открытого пакета ImageJ. Все количественные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения MS Excel. Полученные данные были представлены в виде средней арифметической и её стандартного отклонения. Постобработка данных проточной цитофлуориметрии производилась на сертифицированном приложении анализа данных, прилагаемому к цитометру. Статистический анализ был выполнен с использованием критерия Стьюдента. Данные были представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (стандартная ошибка среднего).

Глава 3. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОСЛОЕВ НАНОЧАСТИЦ

3.1 Характеристика наночастиц

Среди многочисленных типов НЧЗ, различающихся по физико-химическим параметрам и применяемых во многих биомедицинских приложениях, в том числе в работах нашей группы [261], ЗНЗ в настоящей работе были выбраны по нескольким причинам. Главным параметром, обуславливающим эффективность плазмонно-индуцированной оптопорации клеток на платформах НЧЗ, является полное или частичное перекрытие длин волн максимума экстинкции НЧ и источников лазерного излучения [262]. Спектры экстинкции ЗНЗ, синтезируемых по зародышевому протоколу [243], имеют максимум в области 760-780 нм и полуширину порядка 60-80 нм что делает пригодным их применение с выбранными источниками облучения (800-нм непрерывный и 1064-нм импульсный). С другой стороны, оптимизированная технология зародышевого синтеза ЗНЗ, предложенная в работе нашей группы [244], является более оперативной (синтез занимает около 30 мин), хорошо воспроизводимой и масштабируемой чем, например, технология синтеза НСт с аналогичным по положению максимумом ПР в области 800 нм [247] (длительность процедуры синтеза около 30 ч). Кроме того, важными параметрами слоев НЧЗ, используемых в качестве платформ для оптопорации, являются равномерность и величина адсорбции (см. ниже, п. 3.3). Для получения слоев НЧЗ высокого качества необходимо использование дорогостоящей центрифуги со специальным бакет-ротором для планшетов. Наши предварительные эксперименты показали, что сравнительно крупные ЗНЗ в принципе могут осаждаться и под действием собственной силы тяжести. Однако добиться гравитационной седиментации аналогичных по величине максимума экстинкции НСт длиной около 80 нм и толщиной 15-20 нм практически невозможно. Наконец, мы предполагаем, что наличие звездчатой формы способствует локальному усилению электромагнитного

поля на концах шипов под воздействием лазерного излучения [244], что может быть одним из механизмов повышения проницаемости клеточных мембран при проведении оптопорации.

Исходя из вышесказанного, для оценки влияния геометрии НЧ на эффективность доставки и проверки гипотезы о плазмонно-индуцированном механизме, лежащем в основе работы системы оптопорации на слоях НЧЗ, были синтезированы образцы ЗНЗ и НСт с длинами волн ПР в области 800 и 1000 нм. В качестве отрицательного контроля использовали НСф с ПР в области 520 нм, удаленно расположенным от длин волн используемых в работе источников лазерного облучения. Препараты НЧЗ были получены методами жидкофазной химии по стандартным протоколам с нашими незначительными модификациями (см. выше, п. 2.4.1). Типичные спектры экстинкции и примеры ПЭМ-микрофотографий НЧЗ представлены на рис. 3.1.

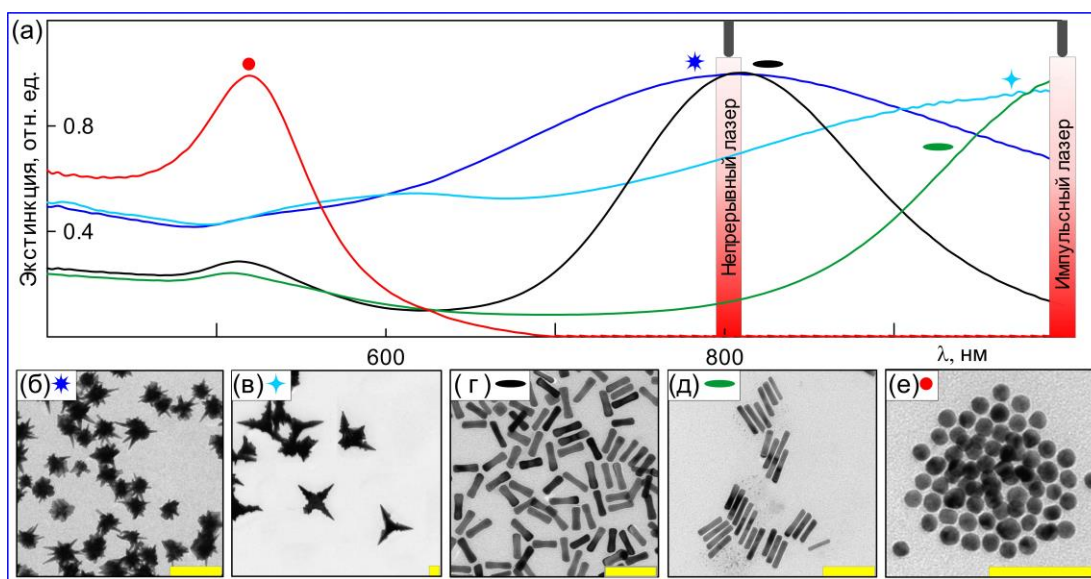


Рисунок 3.1 – Спектры экстинкции (а) и типичные ПЭМ-изображения (б-е) свежеприготовленных коллоидов, используемых в работе. Масштабные метки равны 100 нм.

В таблице 3 суммированы основные характеристики используемых в работе НЧЗ: длины волн максимумов экстинкции; средние значения размеров частиц, полученные путем статистической обработки ЭМ-изображений и обработки данных ДРС (среднего гидродинамического диаметра частиц) и их дзета-потенциалов.

Таблица 3 – Физико-химические характеристики НЧ, используемых в работе

Тип НЧ	λ_{\max} ПР (нм)	Размер* (нм)	ζ -потенциал НЧ (мВ)	ζ -потенциал НЧ+ПЭГ (мВ)	Размер, ДРС** (нм)
ЗНЗ	800	80±7	-22.0 ± 3.0	–	70±18
	1000	354±17	-27.0±2.5	–	–
НСт	800	32±5 / 8±1	11±1.9	-18.7±2.0	41.1±8.5
	1000	67±7 / 12±2	40±2.5	-26±3.2	80±7
НСф	520	15±0.8	-22.5±2.5	–	13±1.7

Примечания: * длина (диаметр)/ толщина, по данным ЭМ-микроскопии

** средний гидродинамический диаметр по данным ДРС

Используемые протоколы синтеза ЗНЗ и НСф приводят к образованию отрицательно заряженных НЧ, которые могут быть непосредственно использованы для приготовления слоев (см. п. 3.2). Напротив, исходные препараты НСт имели положительный дзета-потенциал за счет наличия поверхностного мицеллярного слоя катионного поверхностно-активного вещества ЦТАБ, используемого при синтезе частиц. В связи с этим препараты НСт были дополнительно модифицированы молекулами ПЭГ. Дзета-потенциал полученных НСт-ПЭГ имел отрицательный знак (табл. 3), а цитотоксичный слой ЦТАБ [263] был замещен биосовместимым полимерным лигандом ПЭГ [264].

3.2 Получение слоев НЧЗ

Для получения слоев ассемблированных НЧ на пластиковых (или стеклянных) субстратах была разработана простая универсальная методика [265]. Суть методики состоит в необратимом осаждении НЧЗ при помощи ЦФ, находящихся в суспензионной фазе (3-D), на химически активированные ПВП поверхности (2-D). В качестве субстратов для получения слоев НЧЗ, и последующего использования для оптопорации клеток, были выбраны рабочие поверхности обычного пластика для культивирования клеток: дно лунок планшетов (12-, 24-, 96- луночных) или 35-миллиметровых чашек Петри. Схема процедуры получения слоев НЧЗ изображена на рис. 3.2. Стадия активации поверхности культурального пластика ПВП была необходима для необратимого осаждения и равномерного ассемблирования НЧЗ. Для получения слоев с заданным

содержанием Au, выраженной в терминах количества золота (в мкг) на единицу площади (кв. см), необходимо довести оптические плотности рабочих коллоидных растворов НЧЗ до соответствующих значений. Подробности этих и других расчетов приведены ниже при обсуждении характеристик.

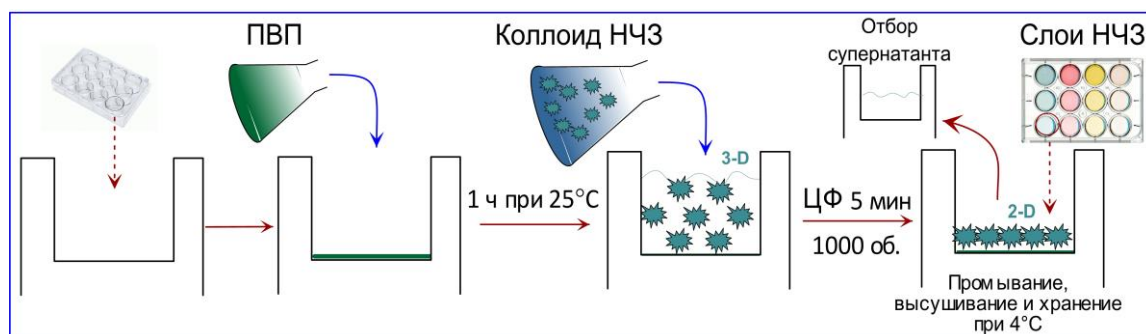


Рисунок 3.2 – Схематическое изображение технологии получения слоев НЧЗ на примере лунки культурального планшета.

Как уже было отмечено в п. 3.1, адсорбция НЧЗ на активированных ПВП поверхностях может происходить путем седиментации частиц либо под действием собственной силы тяжести, либо центробежной. Однако для самоассемблирования требуется значительное время (до 24 ч), и размеры НЧ должны быть достаточно большими (не менее 70 нм). Самоосаждение ЗНЗ-800 приводило к формированию слоев неудовлетворительной равномерности вследствие неконтролируемой агрегации, при этом воспроизводимость также носила случайный характер. Осаждение НСт и НСф путем самоседиментации невозможно в принципе вследствие малого размера частиц по сравнению с ЗНЗ. Напротив, использование метода ЦФ позволяет получить равномерные слои выбранных для работы НЧЗ, и существенно сократить длительность процедуры ассемблирования частиц на ПВП-покрытые лунки планшетов до одного часа. Необходимым условием является подбор оптимальных значения скорости и времени осаждения. При этом. Таким образом, были получены серии слоев НЧЗ дальнейшего использования в экспериментах по оптопорации.

3.3 Характеристика слоев НЧЗ

Как уже было отмечено в п. 3.1, идеальные платформы для плазмонной оптопорации должны быть представлены слоями НЧЗ с равномерно упорядоченными индивидуальными частицами (без агрегатов, с сохранением плазмонных свойств исходных коллоидов, см. рис. 3.3) с известным содержанием Au. Ниже приведены подробные расчеты отдельных физико-химических параметров и примеры характеристик слоев НЧЗ.

3.3.1 Равномерность покрытия

Количественная оценка равномерности покрытия (упорядоченности упаковки частиц в слое) осуществлялась путем регистрации оптической плотности по всей площади слоев НЧЗ на фиксированной длине волны, соответствующей максимуму экстинкции исходных коллоидов. Использование специальной опции 2-D сканирования на ридере Tecan Spark 10M позволяет выразить степень равномерности покрытия в терминах цветового градиента, и определить усредненное значение положения ПР и величины оптической плотности слоя (важный параметр для определения удельного содержания Au, см. ниже, п. 3.3.2) путем стандартной статистической обработки данных. Примеры полученных цветографических диаграмм изображены на рис. 3.3 а-д (на вставках). Различия между длинами волн ПР слоев и исходных коллоидов не более чем на 5-7% свидетельствовало об отсутствии крупных агрегатов при ассемблировании частиц и сохранении плазмонных свойств исходных частиц. Проведение данного оперативного скрининга (не более 5 мин на измерение и обработку данных для 96-луночного планшета) позволило нам оценить пригодность слоев для дальнейшего использования, и выявить слои с неравномерным покрытием (см. например рис. 3.3 д, на вставке).

Качественную оценку равномерности слоев осуществляли методами СЭМ и АСМ, примеры изображений топографии отдельных областей слоев ЗНЗ-800 и НСт-800 представлены на рис. 3.3 е, з и 3.5 б-г, соответственно.

3.3.2 Величина адсорбции

Еще одним важным физико-химическим параметром сборки является адсорбция частиц (θ). Величина адсорбции для каждого типа НЧЗ была определена путем вычитания нормированных значений оптической плотности на длине волны максимума ПР образцов исходных коллоидов и супернатантов после ЦФ. Примеры соответствующих спектров экстинкции приведены на рис. 3.3 а-д. Следует отметить, что добиться полного осаждения коллоида ($\theta=100\%$) в условиях реального эксперимента достаточно проблематично исходя из индивидуальных особенностей частиц различной геометрии.

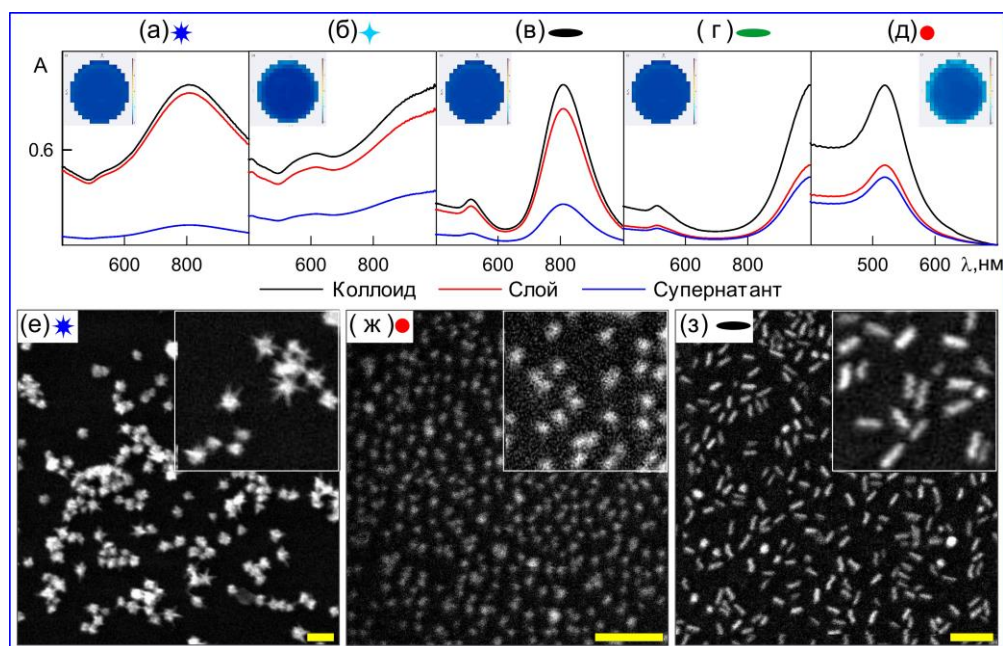


Рисунок 3.3 – Нормированные спектры экстинкции исходных коллоидов, супернатантов после ЦФ, полученных слоев и спектрограммы степени равномерности 2-D слоев (на вставках) ЗНЗ-800 (а), ЗНЗ-1000 (б), НСт-800 (в), НСт-1000 (г), НСф-520 (д). Обзорные и увеличенные (на вставках) СЭМ-микрофотографии слоев ЗНЗ-800 (е), НСф-520 (ж), НСт-800 (з), полученных ЦФ. Масштабные полосы соответствуют 100 нм.

Предположительно, это может быть объяснено следующими причинами. В результате хаотичного осаждения довольно крупных частиц сложной геометрии НСт-1000 и ЗНЗ-1000 образуются неравномерные слои с отдельно лежащими частицами и свободными областями с сопоставимыми по размерам с самими частицами, препятствующими таким образом последующей посадке частиц, даже при многократных циклах ЦФ.

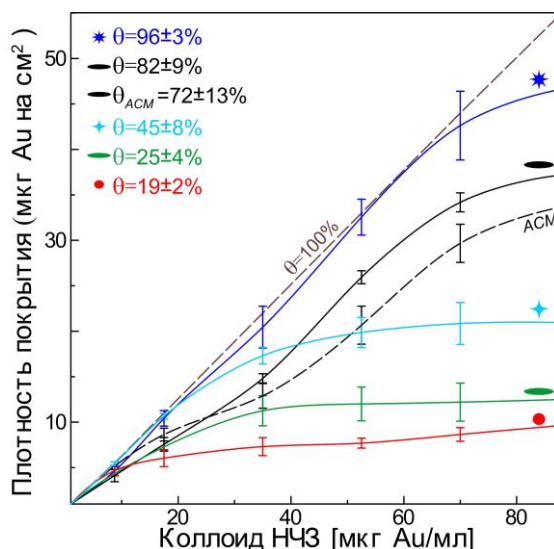


Рисунок 3.4 – Изотермы адсорбции слоев НЧЗ, рассчитанные по данным UV-vis спектроскопии (сплошные линии) и АСМ-микроскопии (черная пунктирная линия), теоретическая кривая для слоя с $\theta = 100\%$ обозначена коричневым пунктиром.

Относительно низкая величина адсорбции НСф-520 может быть объяснена малыми размерами частиц (15 нм по сравнению с 50-150 нм размерами ЗНЗ-800 и НСт-800), для которых невозможно подобрать оптимальные режимы ЦФ. Увеличение скорости или длительности ЦФ приводит к нежелательной агрегации частиц при осаждении.

3.3.3 Плотность упаковки частиц в слое

Получение слоев НЧЗ с требуемой 2-D плотностью упаковки частиц достигается изменением всего одного параметра – оптической плотности добавляемых в лунки коллоидов. Удельное содержание Au (на единицу площади) было рассчитано путем нормирования значений оптической плотности

исходных коллоидов на величину степени адсорбции частиц в слое, с учетом соображений полного восстановления HAuCl_4 при синтезе НЧ, и упаковки частиц не более чем в один монослой. Найденное таким образом содержание Au в слоях НСт-800 составляло 7 ± 0.6 , 14 ± 1.3 и 28 ± 3 мкг/см², что соответствовало $7.9 \pm 0.8 \times 10^{10}$, $1.6 \pm 1.4 \times 10^{11}$ и $3.5 \pm 3.2 \times 10^{11}$ частицам на 1 кв. см.

Вышеописанный спектрофотометрический вариант определения содержания золота в слоях НЧЗ с одной стороны является простым, оперативным и применимым для частиц различной геометрии, с другой стороны – не обладает высокой точностью и не позволяет оценить равномерность упаковки. «Золотым стандартом» количественного определения содержания золота считаются методы атомно-абсорбционной (ААС) [266] и оптической спектрометрии на индуктивно-связанной плазме (ICP-OES) [267], а также масс-спектрометрия на индуктивно-связанной плазме (ICP-MS) [268], традиционно используемые в аналогичных работах. Однако их проведение требует дорогостоящего оборудования, специальной пробоподготовки и высококвалифицированного персонала, и также лишено возможности прямой визуализации. Напротив, методы электронной и зондовой микроскопии позволяют визуализировать наноразмерные объекты и оценить их геометрические параметры. Однако единственным доступным нам вариантом прямой визуализации топографии слоев НЧЗ непосредственно на культуральном пластике является АСМ микроскопия. Для исследования были приготовлены образцы слоев ЗНЗ-800 и НСт-800 на дне 35-мм чашек Петри, исходя из конфигурации предметного столика используемого нами микроскопа. Сложная морфология и полидисперсность частиц ЗНЗ-800 (рис. 3.3 е) затрудняет обработку АСМ-микрофотографий (рис. 3.6 в, верхний ряд), поэтому для количественной оценки были использованы слои НСт-800, представленные частицами с хорошо характеризруемыми геометрическими параметрами. Примеры АСМ-изображений слоев НСт-800 с содержанием Au 7, 14 и 28 мкг/см², соответствующим содержанию Au в исходных коллоидах, используемых для приготовления данных слоев, представлены на рис. 3.5 б-г и рис. 3.6 в (нижний ряд)

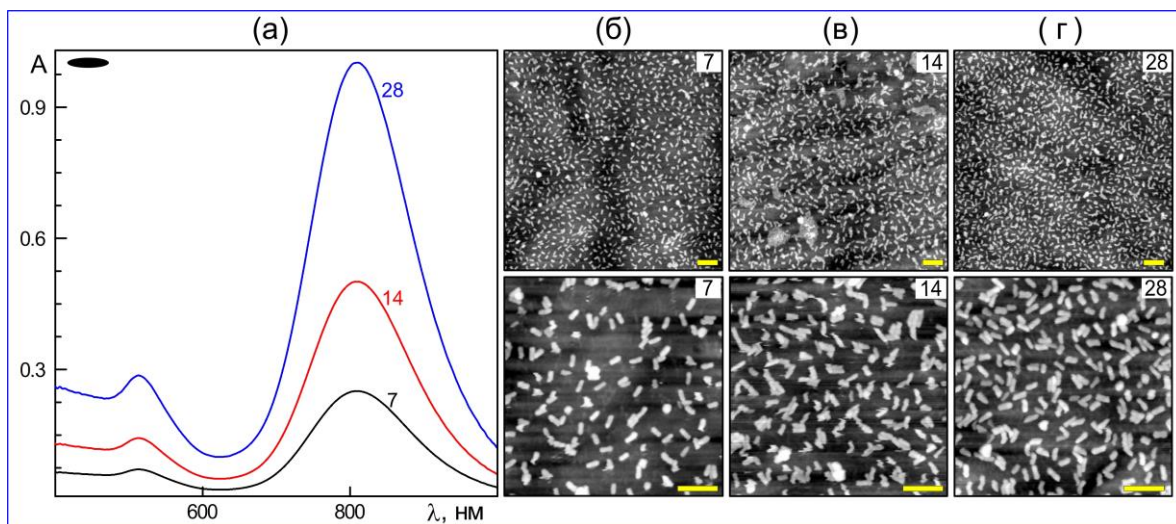


Рисунок 3.5 – Спектры экстинкции (а) и обзорные (верхний ряд) и увеличенные (нижний ряд) АСМ-микрофотографии слоев НСт-800 с содержанием Au 7 (б), 14 (в) и 28 (г) мкг/см². Масштабные полосы соответствуют– 200 нм.

Усредненные значения плотности упаковки частиц в слое НСт-800, найденные путем обработки АСМ-микрофотографий (n=30, суммарное количество частиц не менее 1000 шт.) составляли $2.1 \pm 0.3 \times 10^{10}$, $13 \pm 1.2 \times 10^{10}$ и $40 \pm 3.7 \times 10^{10}$ частиц/см², соответственно. Результаты расчетов 2-D плотности слоев в терминах удельного содержания Au и количества частиц суммированы в табл. 4.

Таблица 4 – Средние значения величины адсорбции (θ), плотности упаковки частиц для слоев НСт-800 с различным содержанием Au, рассчитанные по результатам обработки АСМ-изображений и UV-Vis данных (см. рис. 3.5). Пояснения в тексте. Разброс значений представлен в виде стандартных отклонений (n=7).

*С _{слой}	АСМ	UV-Vis	
	**N _S	N _S	Г (%)
7±0.6	2,1±0.3	7,9±0.8	26±10
14±1.3	13±1.2	16±1.4	81±12
28±3	40±3.7	35±3.2	78±17

Примечания: *С_{слой} – содержание Au, мкг/см²
 **N_S – удельное число частиц, 10¹⁰ шт./см²

Следует отметить, что хорошая сходимость данных (на уровне порядка), полученных двумя независимыми методами, высокоразрешающей зондовой микроскопии и рутинной UV-vis спектрофотометрии, позволяет использовать последний для подобных экспериментов с достаточно высокой точностью. В

таблице 5 суммированы спектральные характеристики, расчетные данные, а также оптимальные значения режимов ЦФ для слоев НЧЗ, используемых в работе.

Таблица 5 – Оптимальные режимы ЦФ, средние значения величины адсорбции (θ), экспериментальные и расчетные данные плотности упаковки частиц и содержания Au слоев НЧЗ всех типов. Пояснения в тексте. Разброс значений представлен в виде стандартных отклонений ($n=x$). (Расчет для слоя $[Au]=44 \text{ мкг/см}^2$ при $\theta=100\%$)

Тип НЧ	Режимы ЦФ*		Диапазо н	Эксперимент			Расчет для монослоя	
	g	Время, мин		θ , %	$C_{\text{слой}}^{**}$	N_S^{***}	$C_{\text{слой}}$	N_S
ЗНЗ-800	1000	5	4-37	96±3	37±3.6	3.3±0.3	327±0.4	26±1.9
ЗНЗ-1000	1000	5	5-21	45±8	20±3.5	7.3±0.8	44±2.1	16±2.1
НСт-800	2000	20	4.8-37	82±9	37±2	1200±156	114.5±12	3800±494
НСт-1000	1000	10	11	25±4	11±1.6	750±83	18.3±1.4	1250±130
НСф-520	2000	30	4-10.6	19±2	11±2	33±2.4	1666±159	5000±493

Примечания: * Центрифуга Eppendorf 5810R, оснащенная бакет-ротором S-4-104 для ЦФ планшетов

** $C_{\text{слой}}$ – содержание Au, мкг/см^2 (расчет по UV-vis данным)

*** N_S – число частиц на единицу площади, $\times 10^8$ шт./ см^2

3.4 Оценка параметров биосовместимости слоев НЧЗ и лазерного облучения

Влияние полученных слоев НЧЗ, активатора поверхности ПВП, а также лазерного облучения на жизнеспособность клеток HeLa, было количественно оценено с использованием набора стандартных цитотоксических тестов. На рисунке 3.6 а и б представлены спектры экстинкции и спектрограммы степени равномерности 2-D слоев ЗНЗ-800 и НСт-800 измеренные до и после облучения. Незначительные отличия спектров экстинкции (не более 5%) облученных и необлученных слоев НЧЗ свидетельствует о сохранении плазмонных свойств НЧ (и полностью исключает открепление частиц и взаимодействие / проникновение в клетки). Дополнительно это было продемонстрировано методом АСМ-сканирования полистироловых чашек Петри со слоями ЗНЗ-800 и НСт-800 на воздухе до и после облучения (рис. 3.6 в). Следует отметить, что даже при облучении на сверхпороговых режимах, вызывающих термическое повреждение дна чашек Петри, слои остаются неизменными (данные не представлены).

Наконец, ни стерилизация 70% этанолом, ни УФ-кварцевание планшетов со слоями НЧЗ перед посадкой клеток также не оказывали на них никакого влияния. Нарушение целостности слоя НЧЗ может быть вызвано только грубым механическим воздействием (например, наконечником дозатора во время неаккуратных манипуляций).

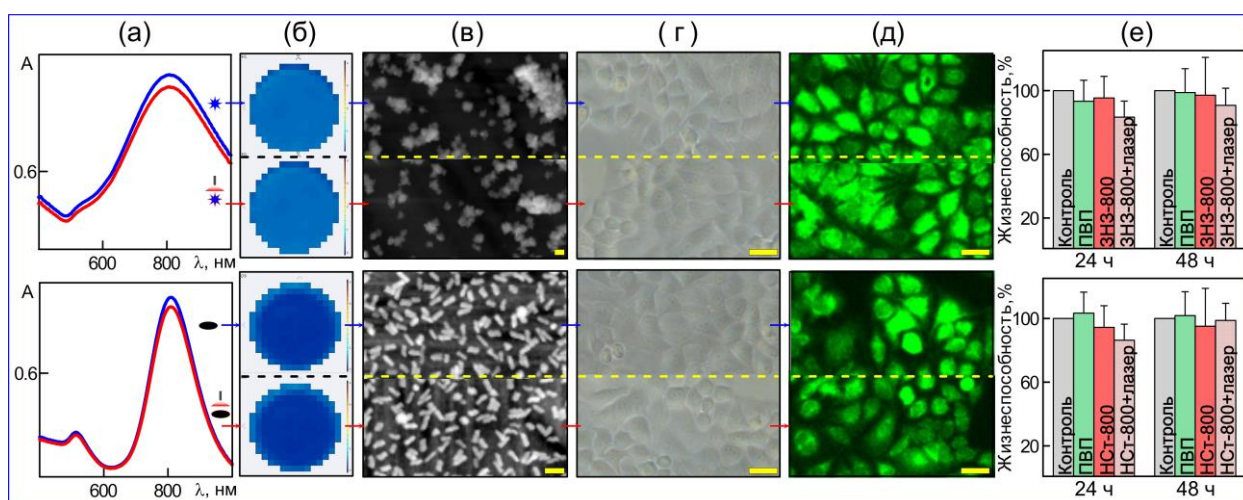


Рисунок 3.6 – Оценка эффектов облучения непрерывным лазером на характеристики слоев ЗНЗ-800 и НСт-800 и жизнеспособность клеток HeLa. Спектры экстинкции слоев (а) и изображения (б-д), полученные до (ряды 1, 3) и после облучения (ряды 2, 4): спектрограммы 2-D равномерности (б) и АСМ-изображения (в) слоев; фазово-контрастные (г) и флуоресцентные (д) микрофотографии клеток после окраски ПИ/ФДА; дыхательная активность клеток по данным резазурин-теста (е). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм. Параметры слоев НЧЗ и режимы облучения: содержание Au 11 мкг/см², длительность облучения – 45 с (ЗНЗ-800) и 60 с (НСт-800).

Следующим этапом была оценка эффекта воздействия лазерного облучения на жизнеспособность клеток. Для этого клетки HeLa культивировали при стандартных условиях в лунках со слоями ЗНЗ-800 и НСт-800, а также в лунках без слоев НЧЗ до достижения 70% конфлюэнтности. После чего облучали лунки с клетками под контролем световой микроскопии. На рис. 3.6 г представлены фазово-контрастные микрофотографии облученных и необлученных клеток, свидетельствующие об отсутствии значимых изменений морфологии клеток и монослоя в целом. Аналогичные данные были получены при проведении теста на живые-мертвые (рис. 3.6 д). Количественная оценка жизнеспособности клеток HeLa также свидетельствует о её поддержании на

высоком уровне (около $90\pm 5\%$ для облученных и $95\pm 4\%$ для необлученных, по данным резазурин-теста, рис. 3.6 е).

Дополнительно была оценена биосовместимость слоев НЧЗ для других клеточных линий: Vero, CHO, A431, HEK293. Представленные микрофотографии клеток, выращенных на слоях НЧЗ и на обычном культуральном пластике (рис. 3.7 а-в), а также данные количественной оценки дыхательной активности клеток (рис. 3.7 з, резазурин-тест) характеризуют полученные слои НЧЗ как нетоксичные подложки для культивирования клеток.

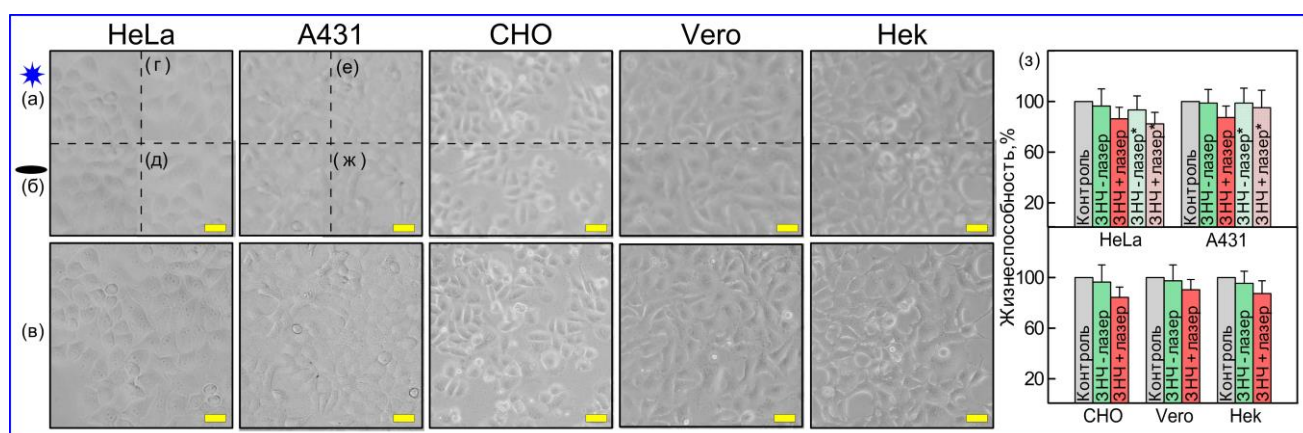


Рисунок 3.7 – Оценка влияния слоев НЧЗ на жизнеспособность клеток млекопитающих.

Микрофотографии клеточных линий HeLa, A431, CHO, Vero, HeK293, выращенных на свежеприготовленных слоях ЗНЗ-800 (а, верхний ряд) и НСт-800 (б, средний ряд) и на стандартном культуральном пластике (в, нижний ряд), а также при повторном использовании тех же слоев (г-ж). Оценка дыхательной активности клеток (резазурин-тест) через 48 ч после культивирования на слоях НЧЗ (з). Планки погрешностей соответствуют величине стандартного отклонения. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Кроме того, была продемонстрирована возможность многократного использования слоев НЧЗ для оптопорации, при проведении повторных циклов культивирования, облучения и удаления клеток путем трипсинизации на одних и тех же слоях (рис. 3.7 г-ж). Следует отметить некоторые особенности культивирования животных клеток на слоях НЧЗ разных типов. При выращивании животных клеток на слоях ЗНЗ-800 и НСт-800 не наблюдалось изменений в их морфологии, скорости роста и жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками (данные не представлены). Однако выращивание клеток на слоях НСт-800 приводило не только к снижению темпа роста клеток

по сравнению с контрольными, но и к небольшому снижению жизнеспособности клеток (на ~10-15%). На слоях НСт-1000 при первичной посадке наблюдался апоптоз клеток в течение первых часов. Однако при повторной посадке в эти же лунки клетки приживались и ничем не отличались по скорости роста и жизнеспособности от контрольных клеток.

Таким образом, была разработана универсальная технология приготовления слоев НЧ, основанная на ЦФ и необратимом осаждении частиц. Данная методика позволяет получать слои НЧ на различных субстратах (культуральном пластике, стекле, пластинках диоксида кремния и т.п.) при активаторе субстрата, модификаторе поверхности НЧ и режимов ЦФ. С помощью этой методики, возможно, получать слои НЧЗ с заданной концентрацией золота на единицу площади. Для проведения всех экспериментов по оптопорации были подготовлены и охарактеризованы серии слоев на различной культуральной посуде (96-, 24-, 12- и 6-луночные планшеты, а также чашки Петри) в количестве не менее 10 шт. для каждого типа НЧ. Проведенные тесты свидетельствуют о полной биосовместимости полученных химически устойчивых покрытий для культивирования различных типов постоянных клеток млекопитающих, об отсутствии значимых эффектов облучения на слои НЧЗ и возможности их многократного использования для оптопорации.

Глава 4. ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОЧИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕДУРЫ ОПТОПОРАЦИИ

Данная глава посвящена детальной оптимизации параметров слоев НЧЗ – плотности и равномерности упаковки частиц, а также режимов лазерного излучения двух типов. Параметры непрерывного 800-нм лазера: длительность, удельная мощность и энергия облучения, площадь единичной облучаемой поверхности. Параметры импульсного 1064-нм лазера: удельная мощность, энергия, длительность и скважность импульса, площадь единичной облучаемой поверхности, скорость 2-D сканирования. В качестве модельного агента для регистрации эффективности оптопорации был использован ПИ. Экспериментально-обоснованный выбор наиболее эффективной платформы для разрабатываемой системы оптопорации позволит минимизировать риски на последующих этапах её апробации.

4.1 Схема процедуры оптопорации

Типичный эксперимент по оптопорации клеток, схематически изображенный на рис. 4.1, включает следующие стадии: культивирование животных клеток в лунках планшетов со слоями НЧЗ; однократное лазерное облучение; добавление в культуральную среду модельных агентов (растворов флуоресцентных красителей или плазмидной ДНК); культивирование клеток и детектирование результатов; мониторинг жизнеспособности клеток на всех стадиях эксперимента. Подробное описание экспериментальных процедур содержится в соответствующих разделах главы 2.

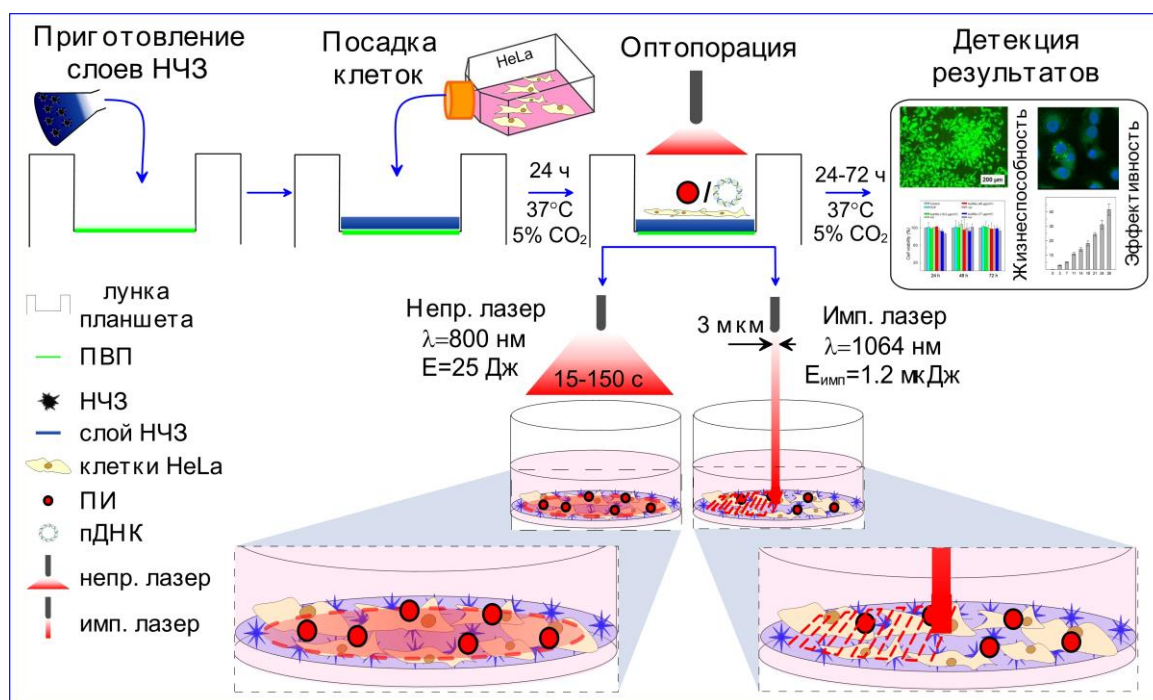


Рисунок 4.1 – Схематическое изображение типичного эксперимента по оптопорации клеток на слоях НЧЗ с применением двух источников лазерного облучения.

4.2 Оптимизация режимов облучения непрерывным лазером

Известно, что НЧЗ могут эффективно преобразовывать поглощенную лазерную энергию в тепло при лазерном облучении [269]. Например, при облучении 808-нм непрерывным лазером с плотностью мощности 1 Вт/см^2 температура раствора НЧЗ (1 мг/мл) повышается почти до $50 \text{ }^\circ\text{C}$ за 300 с, а с увеличением концентрации НЧ она повышается быстрее [270, 271]. С другой стороны, лазер с длиной волны 808 нм, широко используемый в фототермической терапии на основе НЧЗ, находится в так называемом ближнем инфракрасном «окне прозрачности» биотканей (700–900 нм) [272], что обуславливает его безопасность при правильно подобранных режимах. Таким образом, оптимизация условий оптопорации непрерывным лазером на слоях НЧЗ фактически заключается в определении рабочих диапазонов лазера (интенсивности, и соответственно, длительности облучения) при постоянном мониторинге общей температуры клеточной среды. В нашем случае, это осуществлялось при помощи контактной термодпары, погруженной в лунку во

время облучения. Очевидно, что на жизнеспособность клеток главным образом влияет изменение температуры внутри лунки при облучении (физиологическим оптимумом является температура культивирования клеток 37 ± 1 °C). На рисунке 4.2 приведены результаты экспериментального определения оптимальных рабочих параметров процедуры оптопорации для эффективной внутриклеточной доставки молекул ПИ в клетки. Верхний температурный порог (53 ± 2 °C) был определен для клеток, выращенных на слоях ЗНЗ-800, исходя из существенного снижения жизнеспособности клеток (рис. 4.2 б), и флуоресцентной микроскопии (рис. 4.2 в-е). Оптимальный рабочий температурный диапазон находился в пределах 42-45 °C с небольшими вариациями в зависимости от плотности слоя ЗНЗ, близкий по значению к точке фазового перехода двухслойных липосомных мембран (47 °C) [273].

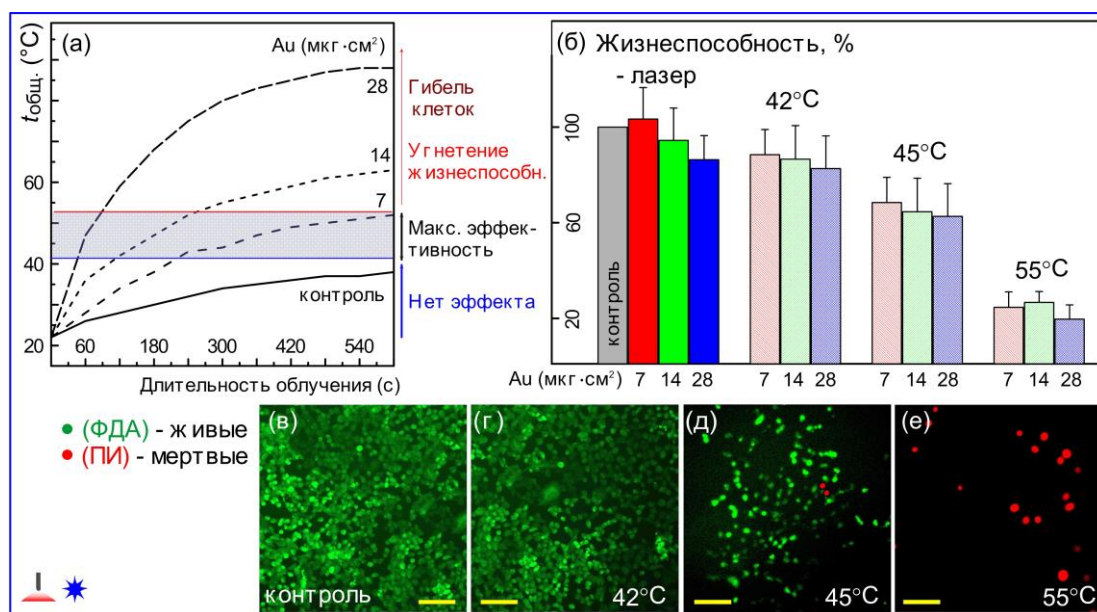


Рисунок 4.2 – Оптимизация режимов оптопорации клеток HeLa непрерывным лазером.

Температурно-временной профиль для слоев ЗНЗ-800 с различным содержанием Au (а); жизнеспособность клеток, облученных до конечной температуры в лунках 42, 45 и 55 °C, спустя 24 ч после оптопорации: дыхательная активность, МТТ-тест (б), флуоресцентные микрофотографии после окраски ПИ/ФДА (в-е).

Нижний температурный порог 38 ± 1 °C (рис. 4.2 а) был определен по отсутствию статистически значимого увеличения ПИ⁺ клеток после облучения контроля в течение 600 с, при этом жизнеспособность клеток была

удовлетворительна. В таблице 6 суммированы оптимальные параметры слоев НЧЗ и режимы облучения непрерывным лазером. Так же при проведении оптимизации параметров было доказано, что на эффективность плазмонной платформы влияет наличие положения плазмонного пика вблизи длины волны источника облучения.

Таблица 6 – Диапазоны значений оптимальных параметров слоев НЧЗ и соответствующих им режимов облучения при оптопорации клеток HeLa непрерывным лазером

Параметры слоев и режимы облучения	ЗНЗ-800	ЗНЗ-1000	НСт-800	НСт-1000	НСф-520
Энергия облучения (Дж)	25				
содержание Au (мкг/см ²)	14-27	18	10-33	12	11
длительность облучения (с)	40-50	300	20-100	200	300
общая температура (°С)	42	37	42	42	37
эффективность*; жизнеспособность** (%)	90±7; 86±12	0; 83±16	88±10; 68±12	79±19; 70±18	0; 99±5
содержание Au (мкг/см ²)	14-27	18	10-33	12	11

Примечания: * по данным подсчета относительного числа ПИ⁺ клеток после оптопорации;
** интегральная оценка по данным резаурин-теста и визуальной оценки состояния монослоя.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что в ряду исследуемых типов плазмонных платформ наиболее перспективными являются слои ЗНЗ-800 с содержанием Au 14-27 мкг/см² по совокупности показателей эффективности оптопорации (90±7%) и жизнеспособности клеток (86±12%). Оптимальные режимы облучения были следующие: энергия облучения 25 Дж (интенсивность, площадь и время облучения составляли 1 Вт/см²; 0.5 см², и 40-50 с, соответственно). Значения эффективности оптопорации клеток на слоях НСт-800 с содержанием Au 10-33 мкг/см² (88±10%) и на слоях ЗНЗ-800, были сопоставимы, однако жизнеспособность клеток была значительно ниже (68±12%), при этом диапазон длительности облучения варьировал от 20 до 100 с. Для достижения удовлетворительной эффективности (79±19%) оптопорации клеток, выращенных на слоях НСт-1000, имеющих незначительное поглощение на длине волны непрерывного 808-нм лазера (см. рис. 3.1 а), требовалось значительное увеличение длительности облучения (до 200 с), жизнеспособность при этом составляла 70±18%. Наконец, непоглощающие на длине волны 808 нм

слои ЗНЗ-1000 и НСф-520 являются непригодными для оптопорации, что отражалось в отсутствии нагрева среды даже при длительном облучении (до 300 с).

4.3 Оптимизация режимов облучения импульсным лазером

Оптимальные режимы облучения импульсным лазером определяли по следующей схеме. Монослой клеток HeLa, выращенных на слоях НЧЗ с фиксированным содержанием Au, подвергались однократному облучению при градиентных значениях одного из параметров и неизменных значениях прочих. Затем интегрально оценивались эффективность (относительное количество ПИ⁺ клеток) и жизнеспособность клеток (визуальная оценка и резазурин-тест), через 30 мин и 24 ч после облучения соответственно (рис. 4.3).

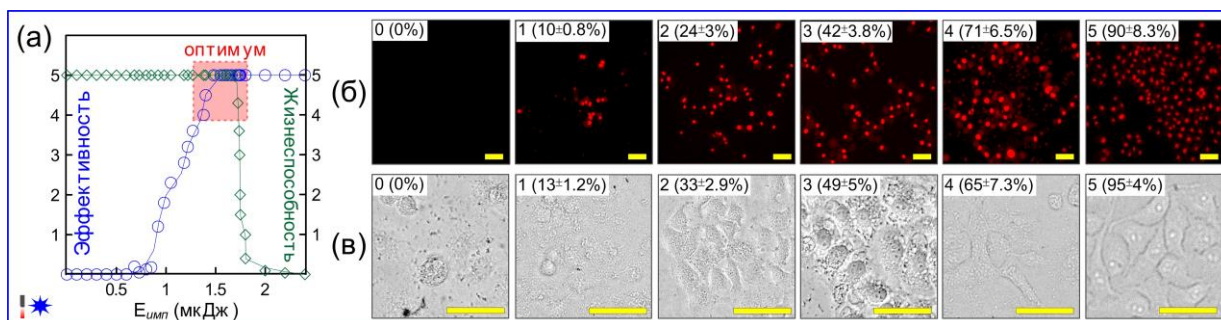


Рисунок 4.3 – Оптимизация режимов оптопорации клеток HeLa импульсным лазером на примере слоев ЗНЗ-800. Флуоресцентные (ряд б) и в фазово-контрастные (ряд в) микрофотографии оптопорированных клеток. На вставках отображены оценочные характеристики по 5-балльной шкале, в скобках – данные количественного учета эффективности (б, количество ПИ⁺ клеток) и жизнеспособности (в, резазурин-тест). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Верхний порог интенсивности облучения ($\sim 3 \pm 0.5$ мкДж) был определен по наличию существенного угнетения жизнеспособности клеток (0-1 балл, рис. 4.3 в). Нижний порог (1.2 ± 0.2 мкДж) был определен по отсутствию статистически значимого увеличения ПИ⁺ клеток после облучения (0-1 балл, рис. 4.3 б), при этом жизнеспособность клеток соответствовала 4-5 баллам (рис. 4.3 в). Оптимальный рабочий диапазон (по совокупности показателей эффективности и жизнеспособности) энергии импульса находился в пределах 1.4-2.7 мкДж с

небольшими вариациями в зависимости от плотности слоя и типа НЧЗ (рис 4.3 а, табл. 7). Визуальная оценка жизнеспособности коррелировала с количественными данными резаурин-теста.

Далее, аналогичным образом были оптимизированы скорость сканирования, длительность и скважность импульса для слоев НЧЗ с фиксированным содержанием Au, найденные значения суммированы в табл. 7.

Таблица 7 – Диапазоны значений оптимальных параметров слоев НЧЗ и соответствующих им режимов облучения при оптопорации клеток HeLa импульсным лазером

Параметры слоев и режимы облучения	ЗНЗ-800	ЗНЗ-1000	НСТ-800	НСТ-1000	НСФ-520
энергия импульса (мкДж)	1.6	2.7	1.4	1.4	5.7
скважность импульса (кГц)	10	10	10	10	10
скорость сканирования (м/с)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
эффективность*; жизнеспособность** (%)	93±6; 86±12	86±11; 83±16	78±19; 68±12	89±9; 70±18	0; 99±5

Примечания: * по данным подсчета относительного числа ПИ⁺ клеток после оптопорации;
** интегральная оценка по данным резаурин-теста и визуальной оценки состояния монослоя.

Был выявлен ряд оптимальных параметров импульсного облучения, которые в дальнейших экспериментах не изменялись. К ним относились длительность импульса (200 нс), скважность импульса (10 кГц) и скорость сканирования (20 мм/с). Среди протестированных плазмонных платформ, наиболее перспективными оказались ЗНЗ-800 с содержанием Au 14-27 мкг/см² по совокупности зарегистрированных значений эффективности оптопорации (93±6%) и жизнеспособности клеток (86±12%), при этом энергия импульса составляла 1.6 мкДж. Оптимальная энергия импульса для слоев НСТ-800 составляла 1.4 мкДж, а эффективность оптопорации и жизнеспособность клеток при этом составляли 78±19% и 68±12%, соответственно. Для ЗНЗ-1000 и НСТ-1000 оптимальная энергия импульса составляла 2.7 и 1.4 мкДж соответственно, по совокупности зарегистрированных значений эффективности (ЗНЗ-1000 – 86±11%, НСТ-1000 – 89±9%) оптопорации и жизнеспособности клеток (ЗНЗ-1000 – 83±16%, НСТ-1000 – 70±18%).

Повышенная эффективность оптопорации клеток на слоях ЗНЗ-800, по сравнению с выращенными клетками на других типах слоев НЧЗ, может быть объяснена широким спектром, в этом случае на длине волны облучения лазером 1064 нм вклад поглощения ЗНЗ-800 остается существенным для эффективной оптопорации (см. рис. 3.1 а). Напротив, низкая эффективность оптопорации клеток на слоях НСт-800, предположительно объясняется относительно узким плазмонным пиком НСт-800 (положение плеча пика экстинкции находится между 650 и 950 нм). Несмотря на то, что максимум ПР для ЗНЗ-1000 и НСт-1000 находится вблизи длины источника облучения, показатели эффективности оптопорации ниже, чем показатели для ЗНЗ-800. Такой эффект можно объяснить плохо регулируемой упаковкой частиц в связи с индивидуальными особенностями НЧ (см. п. 3.3.2), то есть недостаточной плотностью покрытия золота. Следует отметить, что непоглощающие на длине волны импульсного 1064-нм лазера слои НСф-520 являются непригодными для оптопорации, что отражается в отсутствии эффективности.

Анализ приведенных экспериментальных данных, позволяет сделать несколько важных выводов. Во-первых, наиболее перспективными из всех протестированных нами плазмонных платформ для оптопорации являются слои ЗНЗ с максимумом ПР около 800 нм по совокупности зарегистрированных значений эффективности оптопорации ($90 \pm 7 \%$); и жизнеспособности клеток ($86 \pm 12 \%$). При этом слои ЗНЗ оказались лучшими среди протестированных слоев других типов частиц: оперативный и простой синтез коллоидов (одностадийный синтез ЗНЗ занимает менее 30 мин [243, 244]), для сравнения, двухстадийный синтез НСт идет не менее 24 ч [246, 247] с последующей стадией покрытия ПЭГ в течение 24 ч; высокая адсорбционная емкость слоя $96 \pm 3 \%$ позволяет проводить посадку ЗНЗ практически без потерь коллоида в супернатанте.

Глава 5. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЛАЗМОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ОПТОПОРАЦИИ

Комбинация контролируемого взаимодействия лазерного облучения и НЧЗ, не повреждающая клеточную мембрану, может быть основой для создания эффективных способов внутриклеточной доставки биомолекул. Это открывает новые возможности для работы со «сложными объектами», например «трудно трансфицируемые» культуры с низкой скоростью роста, и позволяет экономить время на стадии культивирования клеток до необходимого количества перед началом процедуры трансфекции. Клетки HeLa достаточно часто используются при изучении систем внутриклеточной доставки, относятся к легко трансфицируемым (согласно условному ранжированию клеточных линий при их трансфекции известными коммерческими химическими агентами [274]). Напротив, клетки линии A431 считаются трудно трансфицируемыми по той же классификации, поэтому они были использованы как «сложные» объекты в наших экспериментах.

Апробация разрабатываемой технологии оптотрансфекции была проведена на платформах слоев ЗНЗ-800 (с удельным содержанием [Au] 15 мкг/см²) при найденных для клеток HeLa оптимальных режимах облучения непрерывным (E_{25} Дж, длительность облучения 45 с) и импульсным лазером ($E_{\text{имп}}$ 1.6 мкДж, длительность импульса 200 нс, скважность импульса 10 кГц, скорость сканирования 0.02 м/с). Подробное описание оптимизации параметров оптопорации представлено в разд. 4.5. В качестве модельных объектов использован набор флуоресцирующих молекулярных агентов различной молекулярной массы, а также коммерческие ДНК плазмиды, несущие гены флуоресцентных белков (GLuc, GFP, mCherry), цитомегаловирусный промотор (pCMV) и встроенную кассету антибиотикоустойчивости (к антибиотику G418). Данные векторы и конструкции на их основе являются традиционными модельными объектами при изучении систем внутриклеточной доставки, подробные характеристики представлены в разд. 2.2.

5.1 Оптопорация клеток HeLa для доставки модельных флуоресцентных красителей

5.1.1 Оптопорация непрерывным лазером

В результате проведения серии экспериментов по оптопорации клеток HeLa, выращенных на слоях ЗНЗ-800 с варьирующим содержанием Au в диапазоне от 3 до 28 мкг/см², была выявлена прямая корреляция эффективности доставки молекул ПИ и 2-D плотности слоев ЗНЗ. На диаграмме рис. 5.1 а представлена зависимость относительного количества оптопорированных клеток от содержания Au (по данным микроскопического учета).

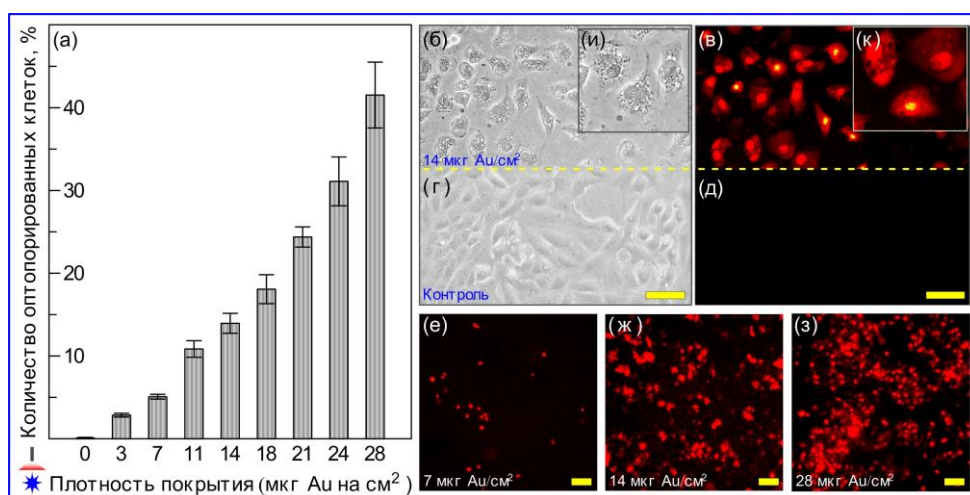


Рисунок 5.1 – Эффективность оптопорации (а) (количество ПИ⁺ клеток) клеток, выращенных на слоях ЗНЗ с содержанием Au. Флуоресцентные и фазово-контрастные изображения контрольных (г, д) и опытных (б, в, е-з, и, к) образцов. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм (а-г) и 200 мкм (з-к).

Примеры флуоресцентных микрофотографий (рис. 5.1 е-з) дополняют данные количественного учета. Фазово-контрастные изображения демонстрируют морфологические изменения облученных клеток (рис. 5.1 б, и) по сравнению с интактными (рис. 5.1 г) уже спустя 1-2 ч после оптопорации. Тем не менее, существенного влияния лазерного облучения на пролиферативную (по данным регулярного визуального мониторинга до 72 ч после оптопорации), дыхательную (93±5% по данным резазурин-теста) активности и общее состояние монослоя

клеток (по данным прижизненного окрашивания ФДА, рис. 4.2 в-е), выявлено не было. Более подробно эффекты облучения на клетки, а также морфологические особенности их самовосстановления будут рассмотрены в главе 6.

Набор ФИТЦ-декстранов различной молекулярной массы был также использован в качестве непроницаемых модельных объектов для доставки в клетки HeLa (рис. 5.2). Флуоресцентный сигнал был обнаружен только в образцах оптопорированных клеток на слоях ЗНЗ-800 (рис. 5.2 г-е).

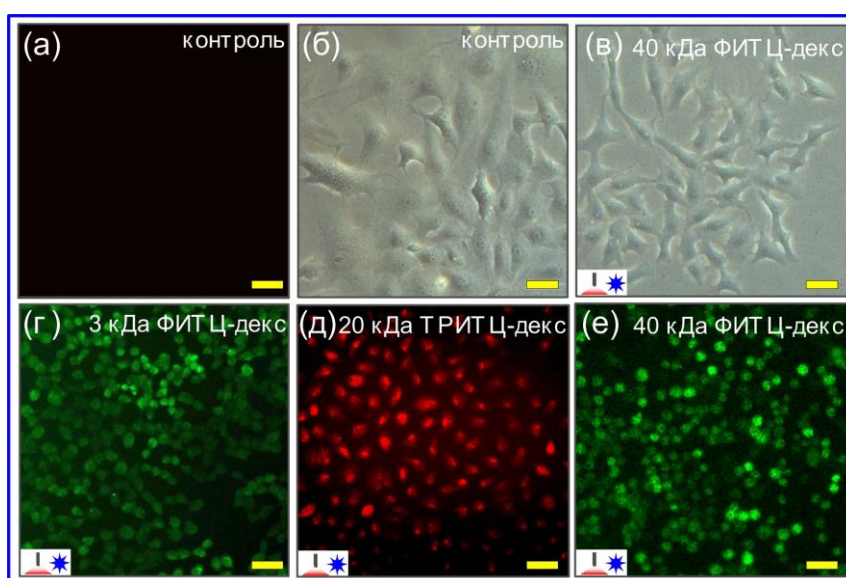


Рисунок 5.2 – Доставка меченных красителем декстранов 3 кДа ФИТЦ (г), 20 кДа ТРИТЦ (д) и 40 кДа ФИТЦ (е) в клетки HeLa после оптопорации. Флуоресцентные изображения были получены с использованием фильтров N21 (г, е) и I3 (а, д). Фазово-контрастные микрофотографии не отображают видимых изменений в клеточном монослое после лазерного облучения (в) по сравнению с непроницаемыми контрольными клетками с нормальной морфологией монослоя клеток (б). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Количественный учет серии микрофотографий показал высокую эффективность проникновения молекул ФИТЦ-декстранов ($95 \pm 5\%$), сопоставимую с эффективностью доставки ПИ. В образцах без лазерной воздействия, либо при облучении клеток, выращенных на обычном пластике (без ЗНЗ) результаты оптопорации были негативными. Кроме того, значимых изменений жизнеспособности клеток не было обнаружено прямым микроскопическим наблюдением и респираторными тестами (данные не представлены).

5.1.2 Оптопорация импульсным лазером

Сканирование образца (монослой клеток) на лазерной установке с источником, имеющим узкофокусированный пучок, в режиме 2-D сканирования, позволила нам очень точно настраивать эффективность оптопорации, комбинируя оптимальные режимы облучения, и параметры слоев НЧЗ. На рисунке 5.3 б продемонстрированы наглядные результаты оптопорации сфокусированным импульсным лазером с разрешением вплоть до единичных клеток.

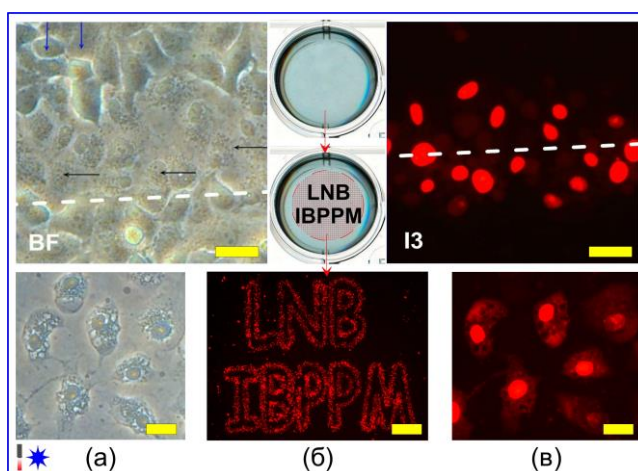


Рисунок 5.3 – Оптопорация клеток HeLa импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800. Фазово-контрастные (а) и флуоресцентные (б, в) микрофотографии клеток (оптопорированные – черные стрелки, белая пунктирная линия; интактные – синие стрелки, пространства выше-ниже белой пунктирной линии). Сверху-вниз (б): лунка 24 луночного планшета; заданная траектория облучения; результирующая микрофотография. Красные светящиеся точки – ПИ⁺ клетки. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм (верхний и нижний ряд – а, в), 500 мкм (нижний ряд – б).

Эффективность оптопорации (количество ПИ⁺ клеток) внутри облученной области составляла не менее 80-95%. Так же на представленных микрофотографиях отчетливо видна граница облученной и необлученной областей монослой клеток, выращенных на слоях ЗНЗ-800. Следует отметить, что морфология клеток существенно отличалась от контрольных уже через 15-30 мин после облучения импульсным лазером. Тем не менее, жизнеспособность сохранялась на высоком уровне (93±5% по данным резазурин-теста), а полное восстановление исходного состояния клетки происходило в течение 5 ч после оптопорации. Более подробно зарегистрированные эффекты изучены в главе 6.

5.2 Оценка эффективности оптопорации для доставки пДНК и временной трансфекции в клетках HeLa

5.2.1 Получение высокоочищенных препаратов пДНК

Необходимое для экспериментов количество высокоочищенного препарата плазмид было наработано с помощью стандартной методики (разд. 2.4.3) клонирования [275] в клетках кишечной палочки *E. coli* XL1-Blue, изображенной на рис. 5.4. Полученные трансформанты, содержащие пДНК, были культивированы в жидкой питательной среде с последующим экстрагированием пДНК в препаративных количествах коммерческим набором для выделения плазмид, затем клетки кишечной палочки и препараты пДНК были криоконсервированы для дальнейшего использования.

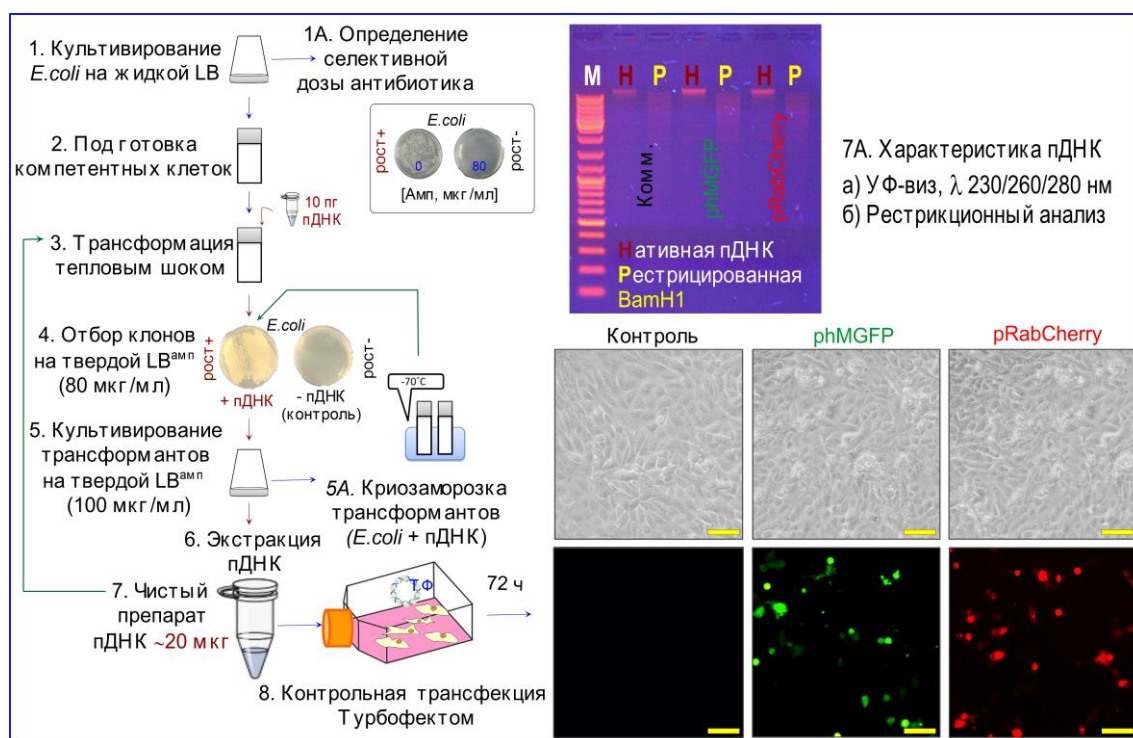


Рисунок 5.4 – Пошаговая схема наработки высокоочищенных препаратов пДНК методом молекулярного клонирования (1-5) в клетках *E. coli* XL1-Blue; рестрикционный анализ (7А) и фазово-контрастные и флуоресцентные микрофотографии клеток HeLa, через 72 ч после контрольной трансфекции ТФ (8). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

В результате были наработаны препараты пДНК: *nGLuc* – 650 мкг; *nGFP* – 170 мкг; *nRFP* – 150 мкг, чистота и количество были оценены стандартной УФ-спектрофотометрией. Рестрикционный анализ (рис 5.4-7А) и контрольная трансфекция клеток HeLa химическим агентом ТФ (рис. 5.4-8) показали полное соответствие оптических и молекулярных параметров исходных образцов.

5.2.2 Оптотрансфекция непрерывным лазером

Количественная оценка эффективности оптопорации и доставки плазмидных ДНК (рис. 5.5) проводилась методами проточной цитофлуориметрии, прямой флуоресцентной и конфокальной микроскопии (относительное количество флуоресцирующих клеток, нормализованное на контроль), а также люминесцентным тестом на определение активности экстраклеточной люциферазы (при трансфекции клеток плазмидой *nGLuc*). Детальное описание пробоподготовки и аналитических процедур приведены в разд. 2.4.6.

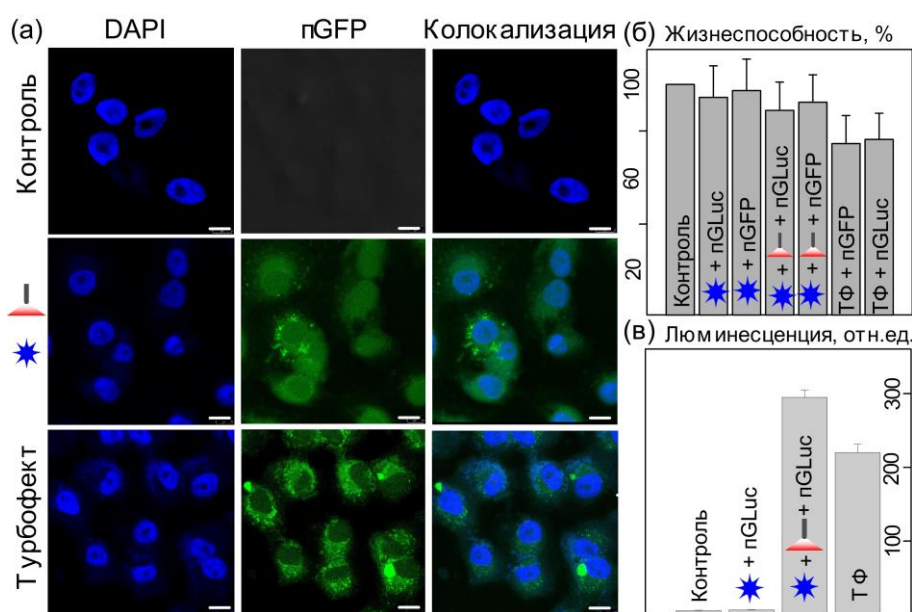


Рисунок 5.5 – Временная трансфекция плазмид в клетках HeLa, результаты сняты через 72 ч после оптопорации непрерывным лазером на слоях ЗНЗ-800. Микрофотографии трансфицированных *nGFP* клеток (а) оптопорацией (средний ряд), и ТФ (нижний ряд) по сравнению с контролем (верхний ряд). Ядра клеток дополнительно окрашены DAPI. Масштабные полосы соответствуют 10 мкм. Жизнеспособность клеток (б, резазурин-тест). Люциферазная активность трансфицированных *nGLuc* плазмидой клеток HeLa, опыт и контроль (в). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Представленные на рис. 5.5 микрофотографии трансфицированных оптопорацией и ТФ (положительный контроль), наглядно демонстрируют, что экспрессия GFP начинается уже спустя 72 ч, для сравнения приведены изображения интактных клеток HeLa (отрицательный контроль). Количественное определение люциферазной активности (рис. 5.5 в) показало, что эффективность оптотрансфекции значительно выше, чем при использовании ТФ для доставки *nGLuc* ($295 \pm 9,8$ RLU и $220 \pm 11,3$ RLU, соответственно). Эффективность оптотрансфекции ($46 \pm 14\%$ GFP⁺ и $42 \pm 9\%$ GLuc⁺ клеток), согласно данным проточной цитофлуориметрии, была чуть ниже значений эффективности трансфекции ТФ ($69 \pm 11\%$ GFP⁺ и $58 \pm 10\%$ GLuc⁺ клеток) (рис. 5.6 а). Однако был выявлен существенный цитотоксический эффект препарата ТФ на клетки ($75 \pm 5\%$ живых клеток по данным резазурин-теста спустя 72 ч после трансфекции), тогда как оптопорация практически не влияла на жизнеспособность клеток ($90 \pm 4\%$) (рис 5.5 б).

5.2.3 Оптотрансфекция импульсным лазером

Апробация метода для доставки плазмидных ДНК была проведена при оптимальных режимах облучения импульсным и параметрах слоев НЧЗ (табл. 7). Экспрессию флуоресцирующих белков регистрировали проточной цитофлуориметрией спустя 72 ч после трансфекции (рис. 5.6 а). Источником возбуждения флуоресценции в проточном цитометре выступал светодиодный лазер с длиной волны 480-560 нм мощностью 200 мВт. Измерение нормализованной интенсивности флуоресценции клеток проводилось по следующему алгоритму: для анализа отбирали объекты, соответствующие целым живым клеткам по форме и размерам, путем отсеки мертвых, фрагментированных клеток и дебриса (рис. 5.6 б); затем определяли порог автофлуоресценции (на образце контрольных клеток, рис. 5.6 в); определяли количество светящихся выше порога автофлуоресценции объектов (рис. 5.6 г).

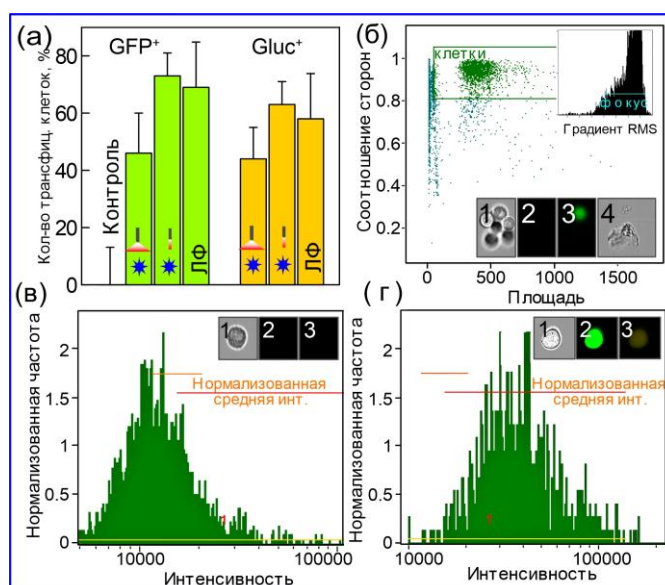


Рисунок 5.6 – Относительное количество флуоресцирующих клеток HeLa (а), спустя 72 ч после оптоотрансфекции непрерывным либо импульсным лазерами, трансфицированных ТФ и контрольных. Алгоритм пост-обработки цитофлуометрических данных (б-г). Примеры микрофотографий дебриса (б 4) и агрегатов клеток (б), контрольных (в) и опытных (г) образцов, снятые на трех каналах цитометра (1, 2, 3).

В одну выборку включалось не менее 4 тысяч объектов, для анализа каждого образца (клетки с одной лунки планшета) было взято от 2 до 4 выборки, суммарное количество клеток составляло не менее 10000 шт. Зарегистрированные проточной цитофлуориметрией значения эффективности оптоотрансфекции ($72 \pm 8\%$ GFP⁺ и $63 \pm 9\%$ GLuc⁺ клеток), полученные, были сравнимы с эффективностью ТФ ($69 \pm 11\%$ GFP⁺ и $58 \pm 10\%$ GLuc⁺ клеток) (рис. 5.6 а), показания жизнеспособности клеток при этом составляли $90 \pm 4\%$ для оптоотрансфекции, $75 \pm 5\%$ для ТФ. Таким образом, разработанная и оптимизированная система оптоотрансфекции на слоях ЗНЗ-800 с применением импульсного лазера позволяет добиться более высоких значений эффективности и жизнеспособности, чем коммерческие трансфицирующие агенты на основе липокатионов.

5.3 Оптотранфекция «трудно трансфицируемых» клеток A431

Апробация системы оптотранфекции импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800 для доставки плазмидных ДНК в «трудно трансфицируемые» клетки была проведена на модельных клетках линии A431. Следует отметить, что протокол трансфекции адгезивных клеточных культур большинством доступных коммерческих системам (в том числе, липокатионными агентами) предусматривает начальную конfluenceность монослоя около 70%. [251]. Фактически отсутствующая возможность оптимизации параметров реагентов и условий проведения липокатионной трансфекции под конкретные особенности клеток и/или доставляемых агентов, негативно отражается на эффективности и выживаемости клеток. Напротив, разрабатываемая нами система показала свои преимущества при работе со «сложными» объектами: тонкая оптимизация параметров облучения импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800 позволила проводить оптотранфекцию при начальной конfluenceности вплоть до 30%. Оптимальные параметры оптотранфекции клеток A431 на слоях ЗНЗ-800 (с удельным содержанием [Au] 15 мкг/см²) непрерывным лазером (E 25 Дж, длительность облучения – 32 с) и импульсным (E_{имп} 1.7 мкДж, длительность импульса 150 нс, скважность импульса 10 кГц, скорость сканирования 0.03 м/с) были определены по описанному в п. 4.3 алгоритму. Согласно цитофлуориметрическим данным, эффективность оптотранфекции была значительно выше (72±12% GFP⁺ и 68±9% GLuc⁺ клеток), чем при трансфекции липофектамином (ЛФ) (18±2% GFP⁺ и 19±1.8% GLuc⁺ клеток) (рис. 5.7 г). Кроме того, ЛФ оказывал существенный цитотоксический эффект (19±1.8% по данным резазурин-теста спустя 72 ч после трансфекции), напротив, жизнеспособность оптопорированных клеток поддерживалась на высоком уровне (92±5%) (рис 5.7 д). Качественная оценка состояния монослоя оптопорированных клеток (рис. 5.7 б) и трансфицированных ЛФ (рис. 5.7 в, большое количество открепившихся и мертвых клеток) по сравнению с контрольными (рис. 5.7 а) дополняет количественные данные.

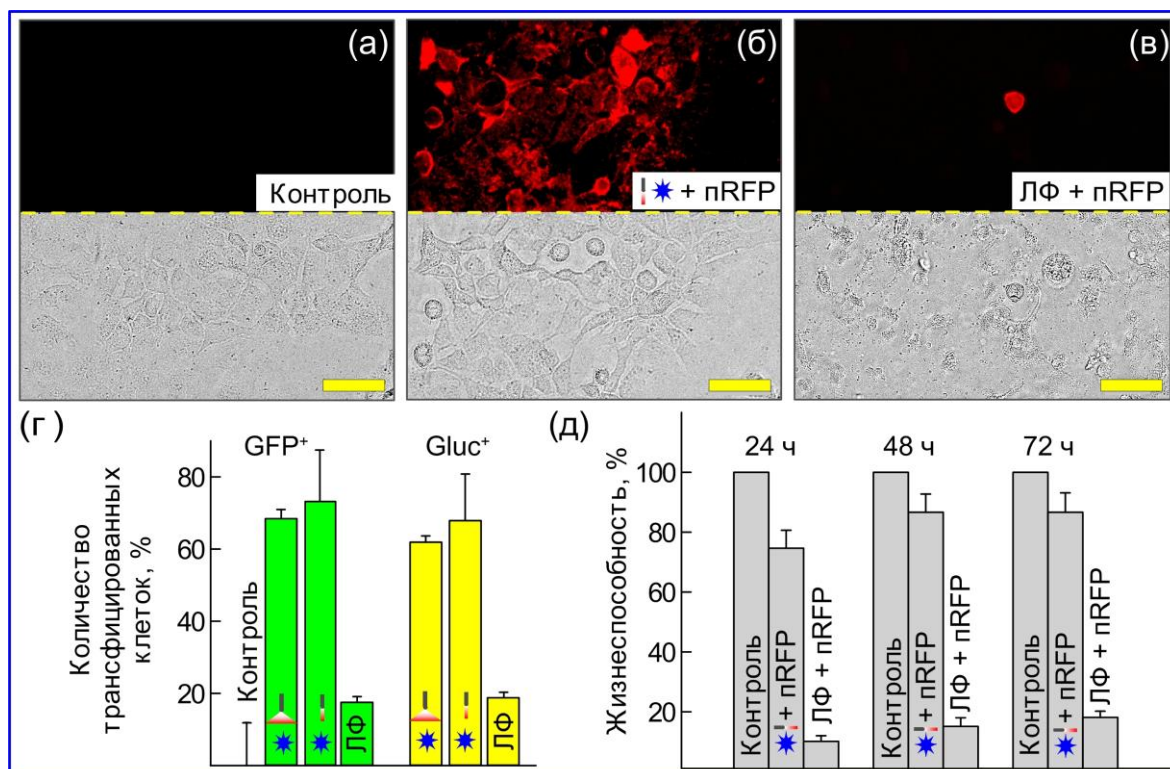


Рисунок 5.7 – Результаты оптоотрансфекции клеток A431 на слоях ЗНЗ-800. Флуоресцентные и фазово-контрастные микрофотографии контрольных (а), оптопорированных (б) и трансфицированных ЛФ (в) клеток. Данные проточной цитометрии: количество оптопорированных непрерывным и импульсным лазерами, трансфицированных ЛФ, относительно контрольных клеток (г). Жизнеспособность клеток (д, резазурин-тест). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Таким образом, разрабатываемая система оптоотрансфекции на плазмонных платформах слоев ЗНЗ-800 позволяет тонко настраивать режимы облучения импульсным лазером под индивидуальные особенности объектов, например, начальную конfluenceнтность монослоя «трудно трансфицируемых» клеток, и существенно повышать эффективность доставки целевых агентов, при незначительном влиянии на жизнеспособность клеток.

5.4 Получение клеточной линии HeLa со стабильной экспрессией гена флуоресцентного белка

Дополнительно была продемонстрирована возможность разработанной системы оптотрансфекции для получения модифицированных клеток со стабильной экспрессией целевых продуктов в результате инсерции доставляемых векторов. Серия экспериментов была выполнена на примере доставки в клетки HeLa плазмид, несущих гены флуоресцентных белков (mCherry / GLuc) по общепринятой процедуре. Наличие постоянной экспрессии mCherry в клетках HeLa было независимо подтверждено флуоресцентной микроскопией (рис. 5.8 а), идентификацией инсерции целевого фрагмента pGLuc полимеразной цепной реакцией была (рис. 5.8 в) а также продолжительным культивированием клеток (не менее 3 месяцев после оптотрансфекции) на среде селективной среде с содержанием антибиотика G418, после цикла криоконсервации/деконсервации.

Микрофотографии модифицированных клеток HeLa, полученные на 21 сутки эксперимента (рис. 5.8 а), демонстрируют в целом аналогичные результаты оптотрансфекции и трансфекции ТФ. Однако средняя выживаемость оптотрансфицированных импульсным лазером клеток (количество образцов на отдельных лунках) при длительном культивировании на селективной среде (рис. 5.8 б), была значительно лучше ($58 \pm 4.3\%$), чем при оптотрансфекции непрерывным лазером ($33 \pm 3.1\%$) и трансфекции ТФ ($29 \pm 3\%$). Согласно данным люциферазного теста (рис. 5.8 в), выход на стабильную продукцию люциферазы оптопорированных клеток происходит раньше, чем трансфицированных ТФ (10-12 и 13-14 сутки, соответственно) при более высокой интенсивности сигнала (295 ± 9.8 и 220 ± 11.3 RLU, соответственно).

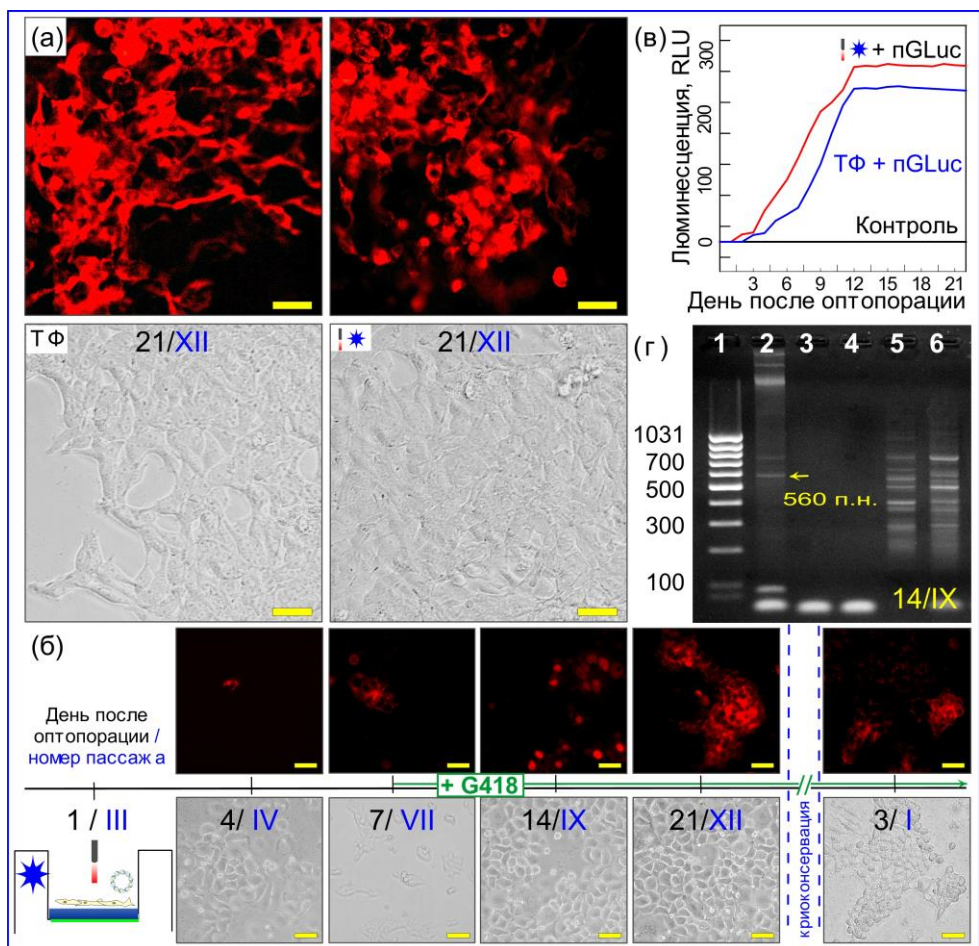


Рисунок 5.8 – Флуоресцентные и фазово-контрастные микрофотографии оптопорированных (а, правый столбец) и трансфицированных ТФ (а, левый столбец) клеток HeLa-mCherry⁺, полученные на 21 сутки после трансфекции. Схема получения модифицированных клеток (б). Люциферазная активность клеток HeLa-GLuc⁺, трансфицированных оптоотрансфекцией, ТФ, и контрольных клеток (в). Результаты ПЦР-анализа на наличие специфической встройки гена GLuc (г). Подписи дорожек электрофореграммы: (1) маркеры длин ДНК; (2) чистая плазмидная ДНК в качестве матрицы; (3) ДНК, выделенная из контроля; (4) вода; ДНК, выделенная из (5) оптопорированных и (6) трансфицированных ТФ клеток. Масштабные метки изображений равны 50 мкм.

Наличие инсерции целевого 560-нуклеотидного фрагмента гена люциферазы было подтверждено ПЦР-анализом с электрофоретической детекцией с использованием фланкирующих пар праймеров, рекомендованных производителем вектора (рис. 5.8 г). Таким образом, были продемонстрированы существенные преимущества оптоотрансфекции импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800, для получения модифицированных клеток HeLa со стабильной экспрессией целевого продукта, перед липокатионными трансфицирующими агентами.

Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ

Данный раздел посвящен исследованию механизмов и рабочих гипотез, лежащих в основе разработанной нами системы оптопорации клеток на слоях НЧЗ. Наиболее интересными и практически неизученными до сих пор являются происходящие при оптопорации клеток события, порождающие неповреждающие изменения целостности липидного бислоя мембран. Фактически, нас интересуют вопросы о природе, длительности существования вновь образованных дефектов липидного бислоя при облучении (эффектов непрерывного и импульсного лазеров) клеток на слоях НЧЗ (различной геометрии и плазмонных свойств), способствующих повышению проницаемости для непенетрирующих макромолекул. Для решения этих и других вопросов применены комплексные подходы на основе высокоразрешающей АСМ и светлопольной фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, а также методы компьютерного моделирования, позволяющие оценить плазмонные эффекты НЧ при воздействии лазерного облучения.

6.1 Связь плазмонных свойств слоев НЧЗ с эффективностью оптопорации

Прежде всего, нас интересовал вопрос, связаны ли возникающие эффекты (увеличение проницаемости мембран при облучении клеток на слоях НЧЗ) с плазмонными свойствами НЧЗ, или это всего лишь тепловые эффекты, возникающие при лазерном облучении, опосредованном НЧЗ. Как уже было отмечено выше в пп. 4.2 и 4.3, эффекты непрерывного и импульсного лазеров принципиально различны [276]. Мы предполагаем, что основной механизм оптопорации непрерывным лазером может быть связан с локальным плазмонным нагревом клеточных мембран, вызванным резонансным поглощением лазерного света ЗНЗ. Ранее уже высказывалась гипотеза, объясняющая спонтанное образование мембранных дефектов за счет нагрева системы до температуры, характерной для фазовых переходов липидных мембран (см., например, обзор [13]). Высокая кинетическая энергия при

достижении порога супрафизиологической температуры, вызывает более интенсивные молекулярные флуктуации и последующую диссоциацию липидов [273]. Было показано, что в живых клетках повышение текучести липидного рафта начинается при 42 °С, а дальнейшее повышение температуры до 55 °С способствует быстрому обмену низкомолекулярными (<1 кДа) молекулами [273]. Во-вторых, при воздействии низких температур (<0 °С) образование кристаллов льда может вызвать механическое расширение и растрескивание клеточной мембраны, которое может быть восстановлено при оттаивании [114]. В-третьих, в физиологическом диапазоне (0-40 °С) быстрое прохождение через мембрану через тепловые фазовые переходы может привести к образованию повреждений, особенно на границах фазовых доменов [273, 277].

Для проверки гипотезы о роли теплового нагрева клеточной среды в качестве потенциального механизма увеличения клеточной проницаемости, планшеты с выращенными на слоях ЗНЗ клетками с добавленным ПИ нагревали на термостатируемой водяной бане до достижения общей температуры 42 °С. Значимых отличий в количестве ПИ⁺ клеток в опыте и контроле до и после нагревания не наблюдалось (данные не показаны). Следовательно, простой нагрев системы не может рассматриваться как потенциальный механизм оптопорации.

Для понимания некоторых фототермических механизмов было проведено моделирование электромагнитных свойств и даны простые оценки тепловых параметров, характерные для лазерного нагрева с использованием модели ЗНЗ, близкой по геометрии к используемым в экспериментах ЗНЗ-800. Преобразование света в тепло плазмонной частицей характеризуется ее поперечным сечением поглощения и передачей тепла от частицы к окружающей среде. Моделирование оптических свойств было проведено с использованием метода конечных элементов (FEM), реализованного в COMSOL Multiphysics v5.1 (модуль Wave Optics), подробный алгоритм описан в нашей работе [278]. Оптические константы золота и воды были рассчитаны, как описано в [279]. В результате моделирования температура облученных ЗНЗ оказалась очень

близкой к температуре клеточной среды (воды) из-за быстрого отведения генерируемого тепла от золота к воде. Такая ситуация кардинально отличается от пико- или наносекундного импульсного режима, когда температура золота может достигать огромных значений, вызывая плавление золота и образования пузырьков [279, 280] и нанокавитации [281]. Более того, вычисленная ничтожная разница между температурами золота и воды означает, что мы можем следить за температурой НЧ посредством простого измерения нагрева воды со временем облучения.

Чтобы оценить прирост температуры воды, мы можем использовать два подхода. В первом не используется модельное предположение о плазмонных частицах, в то время как второе основано на количественных концентрационных и абсорбционных свойствах ЗНЗ. В первом случае поглощенная энергия рассчитывается по соотношению

$$W_a = I_0 \times (1 - 10^{-A}) \times S \times t, \quad (1)$$

где S – площадь облучения, равная площади лунки $0,5 \text{ см}^2$ для 96-луночного культурального планшета, A это измеренное поглощение и t время облучения. Для типичных экспериментальных условий коэффициент пропускания монослоя 10^{-A} составляет около 50%, $1 - 10^{-A} \sim 0.5$, а для времени облучения $t = 50 \text{ с}$ поглощенная энергия составляет $W_a = 12 \text{ Дж}$. Поэтому приращение температуры после 1-минутного облучения составляет $\Delta T = W_a / c_w m_w \approx 15 \text{ }^\circ\text{К}$, что находится в тесном соответствии с экспериментальными данными. Здесь c_w это теплоемкость, а $m_w = 0.2 \text{ г}$ – масса воды в лунке.

Во втором подходе общее количество ЗНЗ в адсорбированном монослое может быть рассчитано из поверхностной плотности частиц $\rho_s (\text{г} \times \text{см}^{-2})$, массы отдельной частицы m_1 и поверхности лунки S . Среднюю массу m_1 можно оценить по массовой объемной концентрации, $c_g = 142 \text{ } \mu\text{г}/\text{мЛ}$, и средней числовой концентрации, $N \approx 1.5 \times 10^{11} \text{ см}^{-3}$, свежесинтезированных ЗНЗ:

$m_1 = c_g / N \approx 10^{-15}$ г. Следовательно, для поверхностной плотности $\rho_s = 14.2 \text{ г} \times \text{см}^{-2}$, общее количество адсорбированных частиц составляет $N_s = \rho_s (\text{г} \times \text{см}^{-2}) \times S (\text{см}^2) / m_1 (\text{г}) \approx 0.75 \times 10^{10}$. Такое же значение получается из начальной числовой концентрации $N (\text{см}^{-3})$, добавленного объема 0,2 мл и коэффициента разбавления 1:4: $N_s = N (\text{см}^{-3}) \times V (\text{см}^3) / 4 \approx 0.75 \times 10^{10}$. Таким образом, удельная мощность равна $P_a = I_0 \sigma_a (800) N_s \approx 1 (\text{W} / \text{см}^2) \times 0.2 \cdot 10^{-10} (\text{см}^2) \times 0.75 \cdot 10^{10} \approx 0.14 \text{ W}$, а доставляемая энергия равна $W_a = 7$ Дж при облучении длительностью 50 с. Эта величина согласуется со значением 12 Дж, полученным непосредственно из спектров поглощения монослоя. Если мы возьмем приведенную выше среднюю оценку, доставленная энергия $\sigma_a (800) = 1.0 \times 10^{-10}$ будет в пять раз выше, 35 Дж. Учитывая большую неопределенность в отношении концентрации частиц и среднего сечения поглощения, можно заключить, что оба подхода дают адекватные оценки для поглощенной энергии света и приращения температуры.

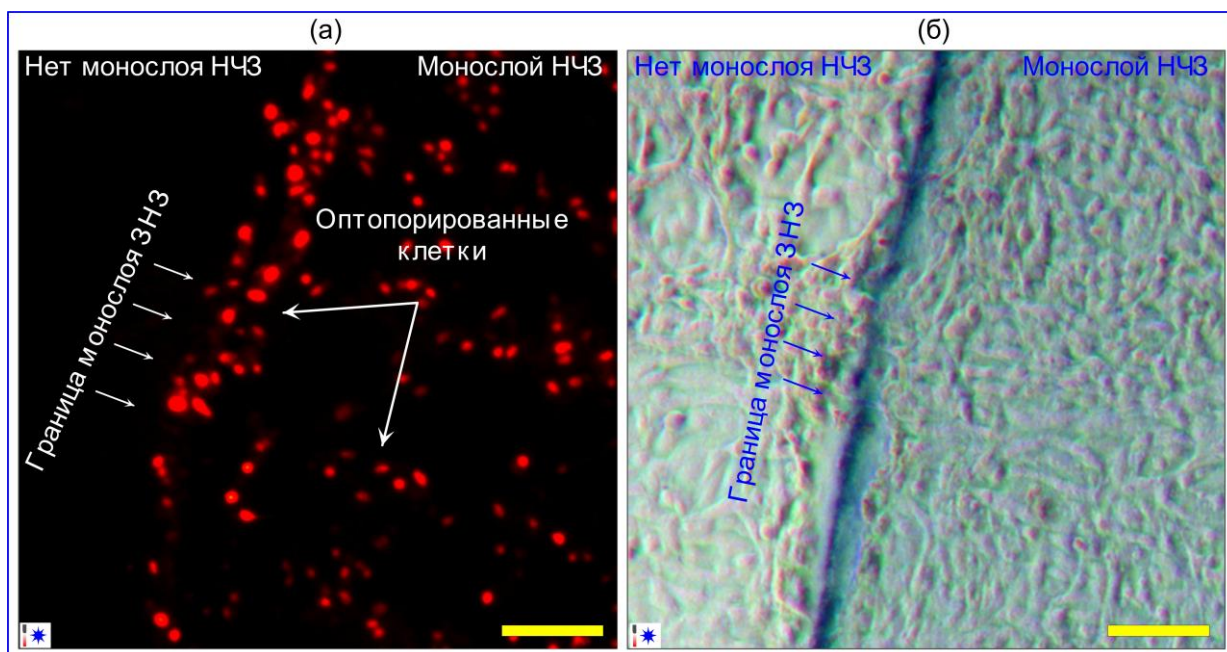


Рисунок 6.1 – Визуализация зависимости эффективности оптопорации от плазмонных свойств слоев НЧЗ на примере доставки ПИ в клетки линии HeLa. Микрофотографии клеток, снятые во флуоресцентном (а) и фазово-контрастном (б) режимах. Масштабные полосы соответствуют 100 нм.

Аналогично, отрицательные результаты оптопорации были получены при облучении клеток, культивируемых без слоев НЧЗ (рис. 6.1), и при воздействии лазером длиной волны, удаленно расположенной от максимума ПР (на платформах слоев НСф-520, см. п.п. 4.2-4.3).

6.2 Длительность самовосстановления клеток после оптопорации

Следующим вопросом является длительность восстановления непроницаемости клеточных мембран и общего морфофункционального состояния облученных клеток. Повреждения мембраны, образованные короткой импульсной лазерной обработкой с использованием золотых НЧ, добавленных в культуральную среду, полностью затягиваются в течение нескольких секунд и делают мембрану непроницаемой для молекул-мишеней [282]. Для исследования процессов самовосстановления клеток после оптопорации, интерпретируемых через непроницаемость мембран для непенетрирующих агентов, была выполнена следующая серия экспериментов. Клетки HeLa были выращены в нескольких лунках со слоями ЗНЗ-800, после однократного облучения ИК-лазером (непрерывным либо импульсным при оптимальных режимах), был добавлен раствор ПИ в различные временные промежутки (рис. 6.2). Оказалось, что восстановление мембран начинается уже спустя 2 ч после оптопорации непрерывным лазером ($43 \pm 7\%$ ПИ⁺ клеток) (рис. 6.2 б, синяя линия), а спустя 30 ч мембраны клеток становятся полностью непроницаемыми для ПИ (рис. 6.2 б, синяя линия, к). Жизнеспособность клеток по данным МТТ-теста поддерживалась на высоком уровне (рис. 6.2 а), целостность мембраны была качественно подтверждена путем витального окрашивания монослоя клеток красителем ФДА (рис. 4.2 в-е).

В настоящий момент нам неизвестны точные объяснения такой удивительно длительной задержки, необходимой для полного восстановления непроницаемости мембраны.

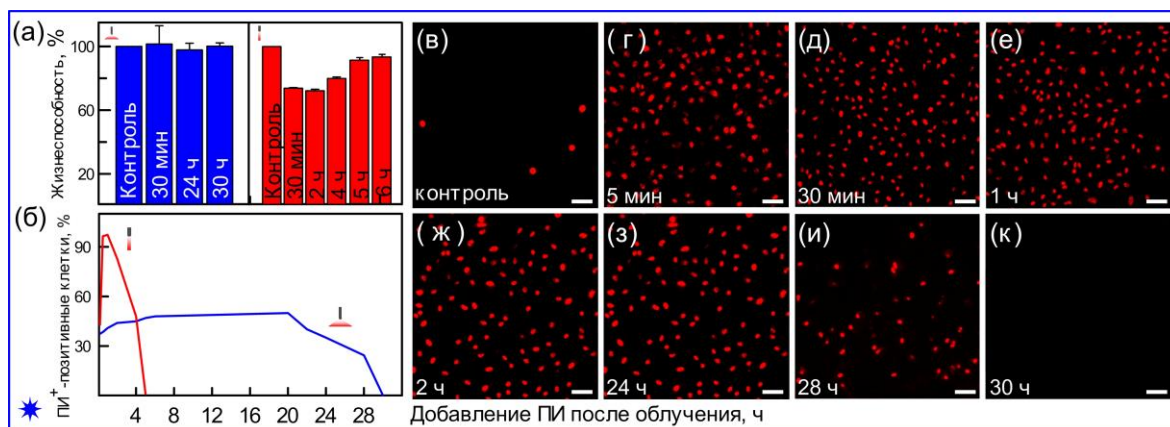


Рисунок 6.2 – Определение времени самовосстановления непроницаемости мембран клеток после облучения ИК-лазером. Жизнеспособность контрольных и опытных клеток (а), эффективность оптопорации (б) и флуоресцентные изображения контрольных клеток (в) и опытных клеток (г – к) с добавленным ПИ в различное время после облучения. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Одним из возможных объяснений является малый размер молекул ПИ, приводящий к неверной интерпретации полученных результатов. Недавно было продемонстрировано [201], что полное закрытие мембран для кальцеинового красителя может происходить в течение нескольких минут после облучения. Согласно объяснению автора [201], микрометровые поры, образованные кавитационным пузырьком, быстро сжимаются, чтобы исключить доставку больших молекул, например ДНК плазмид, но остаются проницаемыми для малых молекул, таких как ПИ.

Время, необходимое для полного восстановления непроницаемости мембран после облучения импульсным лазером, определялось по описанной выше схеме. Таким образом, было определено, что после облучения импульсным лазером клеткам требовалось значительно меньше времени для полного восстановления мембран. Уже через 30 мин начиналось восстановление целостности мембран, при этом количество ПИ⁺ клеток составляло $95 \pm 5\%$, а спустя 5 ч после облучения мембраны стали полностью непроницаемыми для ПИ (рис. 6.2 б, красная линия). При этом жизнеспособность (по данным резазурин-теста) спустя 30 мин после облучения достигала $73 \pm 6\%$, а спустя 5 ч после облучения жизнеспособность оптопорированных клеток ($93 \pm 4\%$) практически соответствовала контролю (рис. 6.2 а).

6.3 Изучение механических свойств клеток

Отдельно было проведено сравнительное изучение механических свойств облученных ИК-лазером и необлученных (контрольных) клеток HeLa, выращенных на слоях ЗНЗ-800 и НСт-800, с использованием прижизненной съемки методом высокоразрешающей АСМ-микроскопии. Детальное описание пробоподготовки, режимов сканирования и аналитических процедур приведены в разд. 2.4.9. Топографические АСМ-карты восстановлены по положениям точек контакта кривых (z , в мкм), и распределению значений МЮ (Па, логарифмический масштаб). Затем были выбраны силовые кривые, соответствующие отдельным клеткам. Результирующие обобщенные данные представлены на рис. 6.3 и 6.4, точки на диаграммах соответствуют среднему значению МЮ отдельных клетки, прямоугольные области соответствуют медианам, 25-й и 75-й процентилям. Как видно из представленных данных, обнаружена значительная разница в динамике механических свойств клеток при облучении непрерывным и импульсным лазерами. В принципе, механические свойства живой клетки являются индикатором общего состояния. Ранее было отмечено, что изменение жесткости клеток, обычно уменьшение, связано с неблагоприятными воздействиями, например инкубацией с токсичными НЧ [283, 284], холодовом стрессе [285] и пр. Модификации механических свойств клеток, как было показано в ряде предыдущих исследований, связаны с изменениями в структуре цитоскелета [259, 286, 287]. Было обнаружено, что измеренные с помощью АСМ изменения механических параметров живых клеток связаны с динамикой актинового цитоскелета. В самом деле, модификация цитоскелета была непосредственно показана в оптопорированных клетках с помощью флуоресцентной микроскопии [288] и проявлялась в уменьшении выравнивания или когерентности актиновых волокон. Поскольку актиновый цитоскелет (в частности, актиновый кортекс) связан с клеточной мембраной, структурные изменения в последней, включая повторное уплотнение мембраны, также вызывают модификацию структуры актина [289]. Более того, нарушение

концентрации внутриклеточных сигнальных молекул и ионов, выходящих во внеклеточную среду через вновь образованные мембранные отверстия при оптопорации, может вызывать глобальные долговременные перестройки актина. Мы предполагаем, что зарегистрированное уменьшение МЮ в облученных импульсным лазером клетках HeLa может быть связано с ослаблением структуры актинового цитоскелета: МЮ оптопорированных клеток постепенно уменьшался (спустя 1 ч – 1600 ± 900 Па, спустя 5 ч – 1400 ± 500 Па). Восстановление цитоскелета происходило в те же сроки, что и восстановление плазматической мембраны и общего состояния клеток, как видно из экспериментов по внутриклеточной доставке ПИ (рис. 6.2 б).

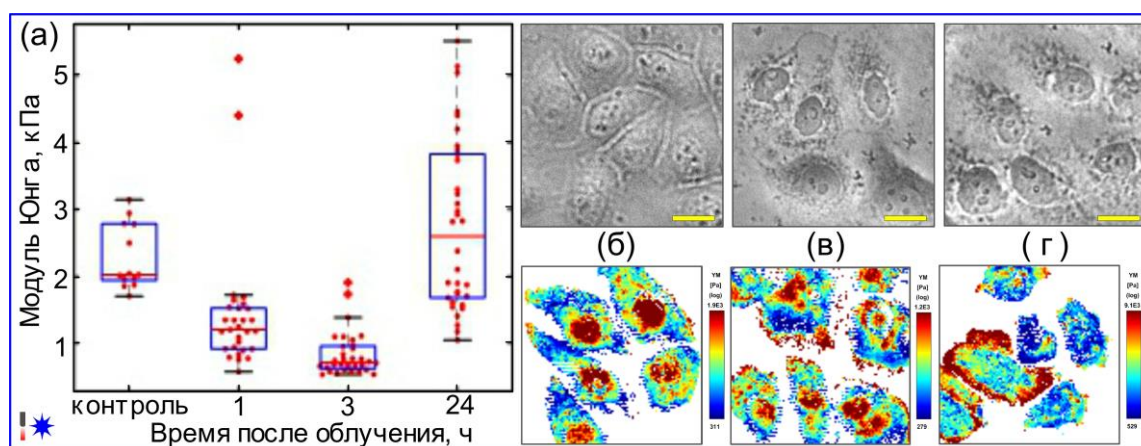


Рисунок 6.3 – Распределение МЮ (а) в популяции оптопорированных импульсным лазером клеток HeLa, выращенных на слоях ЗНЗ-800. Примеры фазово-контрастных микрофотографий (верхний ряд) и карты механических свойств (нижний ряд) оптопорированных клеток через 1, 3 и 24 ч после облучения (б-г). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для группы клеток, $n=30$. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Облучение непрерывным лазером, по-видимому, вызывало более резкие эффекты и некоторые сигнальные каскады, приводящие к увеличению жесткости клеток (в течение 20-24 ч после облучения – 10800 ± 4200 Па по сравнению с контрольными – 2100 ± 700 Па, рис. 6.4).

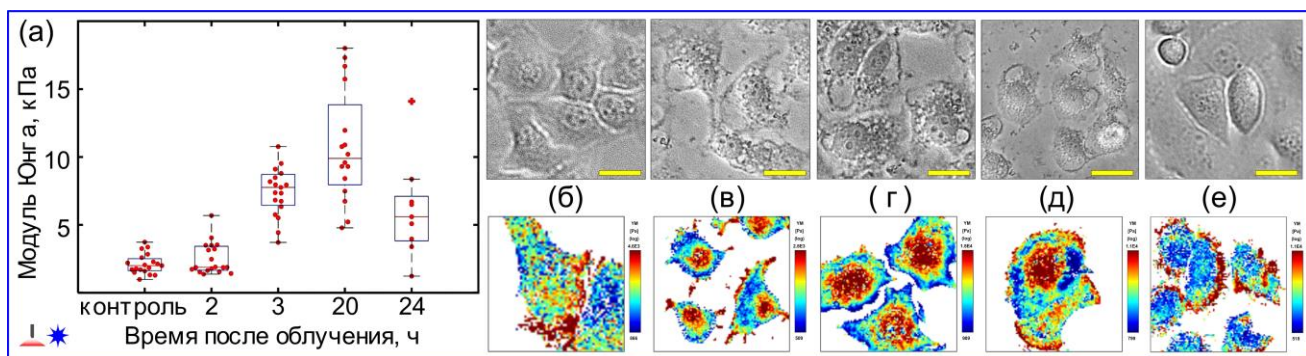


Рисунок 6.4 – Распределение МЮ (а) в популяции оптопорированных непрерывным лазером клеток HeLa, выращенных на слоях ЗНЗ-800. Примеры фазово-контрастных микрофотографий (верхний ряд) и карты механических свойств (нижний ряд), контрольных (б) и оптопорированных клеток через 2, 3, 20 и 24 ч после облучения (в-е). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для группы клеток, $n=30$. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Эти каскады могут играть защитную роль для ядра клетки. В предыдущем исследовании [285] значительное увеличение жесткости клеток также наблюдалось во время прогрессирующей гибели клеток и потери целостности мембран. Однако в нашем случае эти эффекты, по-видимому, в основном обратимы, поскольку не приводят к гибели клеток.

Таким образом, по результатам двух независимых серий экспериментов с использованием методов флуоресцентной и прижизненной АСМ-микроскопии, были зарегистрированы данные, имеющие парную корреляцию. Мы считаем, что наблюдаемые эффекты столь длительного самовосстановления клеток после оптопорации, не приводящие к их гибели, интересны не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. Продолжительное сохранение проницаемости мембран клеток для доставляемых агентов как минимум в течение 2-3 ч после оптопорации импульсным, и более 20 ч при оптопорации непрерывным лазером на слоях НЧЗ может быть полезно при использовании нашей системы для ко-трансфекции, с последовательными циклами введения в клетки различных векторов после однократного лазерного воздействия. Возможность проведения подобных манипуляций может открыть новые перспективы в области геномного редактирования клеток. Насколько нам известно, ни одна из существующих на сегодняшний день систем внутриклеточной доставки подобной уникальной «опцией» не обладает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Несмотря на большое разнообразие методов, поиск универсальных способов внутриклеточной доставки продолжается. Апробация разработанной нами системы плазмонно-индуцированной оптопорации на слоях НЧЗ с использованием комплекса современных аналитических и микроскопических методов на различных клеточных моделях и агентах для доставки свидетельствует об её преимуществах перед известными технологиями внутриклеточной доставки. Возможность тонкой настройки индивидуальных параметров слоев НЧЗ и параметров облучения под конкретные свойства клеток и доставляемых агентов, была отражена совокупностью зарегистрированных высоких показателей эффективности оптопорации и жизнеспособности клеток млекопитающих. Были получены новые данные о механизмах и проверены рабочие гипотезы, лежащие в основе системы оптопорации клеток на слоях НЧЗ, определены параметры самовосстановления мембран и изучены механические свойства клеток при облучении непрерывным и импульсным ИК-лазерами.

Таким образом, тематика диссертационной работы остается актуальной и заслуживает продолжения. Результаты работы могут быть востребованы в лабораторной и клинической практике, как основа новых разработок в области клеточной инженерии, генной терапии, молекулярной диагностики, фармакологии и пр., направленных на переход к персонализированной медицине и улучшению качества жизни и здоровья населения.

Основные результаты и выводы:

1. С применением разработанной универсальной технологии получения биосовместимых слоев НЧ с контролируемыми физико-химическими параметрами (плотность нанесения, равномерность слоя, коэффициент поглощения света слоем НЧЗ, природа субстрата) получены новые данные о возможных механизмах плазмонной оптопорации клеток на платформах слоев НЧЗ и проверены гипотезы относительно поведения отдельных компонентов

системы. Показано, что кратковременное увеличение проницаемости мембран клеток при оптопорации на слоях НЧЗ, происходит за счет локального нагрева НЧ под воздействием лазерного излучения с длиной волны, частично или полностью перекрывающейся с длиной волны ПР.

2. Выявлено, что слои ЗНЗ-800 с удельным содержанием Au ~ 15 мкг/см² являются наиболее эффективными платформами для оптопорации. Определены оптимальные параметры облучения клеток HeLa двумя источниками лазерного излучения: температурный диапазон 42-45 °С, энергия облучения 25 Дж (интенсивность, длительность облучения, площадь единичной облучаемой поверхности 1 Вт/см², 40-50 с и 0.5 см², соответственно) для непрерывного 808-нм лазера; энергия импульса 1.5 мкДж при длительности и скважности импульса 200 нс и 10 кГц, соответственно, для импульсного 1064-нм лазера в режиме 2-D сканирования со скоростью 0.05 м/с.

3. Разработанная и оптимизированная система оптотрансфекции импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800 имеет более высокие показатели эффективности ($72\pm 12\%$) и жизнеспособности клеток ($92\pm 5\%$) для доставки модельных плазмид в клетки HeLa, существенное преимущество перед коммерческими агентами для трансфекции ($19\pm 1.8\%$) для доставки плазмид в «трудно трансфицируемые» клетки линии A431 и для получения модифицированных клеток HeLa со стабильной экспрессией целевого продукта (средняя выживаемость оптопорированных трансфектантов выше на 30%, чем при трансфекции липокатионами).

4. Методами прижизненной зондовой и флуоресцентной микроскопии изучены механические свойства и зарегистрирована длительность полного самовосстановления клеток HeLa после оптопорации непрерывным и импульсным лазером, составляющая 30 и 5 ч, соответственно, характерная для процессов регенерации живых клеток в ответ на стрессовое воздействие лазерного облучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особенную благодарность к.б.н. Пылаеву Т.Е. за помощь в формулировании положений диссертации, полезные советы и поддержку на всех этапах работы. При выполнении диссертационной работы автор пользовался советами и помощью д.ф.-м.н. Хлебцова Б.Н. и зав. лабораторией нанобиотехнологии д.ф.-м.н. Хлебцова Н.Г. и выражает им искреннюю благодарность.

Автор выражает глубокую признательность д.б.н. В.А. Богатыреву и Л.А. Дыкману за критические замечания и полезные советы при написании рукописи, к.б.н. Ефремову Ю.М. за помощь в выполнении измерений методом атомно-силовой микроскопии, Верховскому Р.А., за помощь в проведении цитофлуориметрического анализа, д.ф.-м.н. Хлебцову Б.Н. за помощь в синтезе наночастиц, к.х.н. Бурову А.М. и к.ф.-м.н. Захаревичу А.М. за помощь в выполнении электронно-микроскопических измерений, к.ф.-м.н. Браташову Д.Н. за помощь в проведении конфокально-микроскопических исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

BLAST – biophotonic laser-assisted surgery tool

shРНК – малые шпилечные РНК

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АСО – антисмысловые олигонуклеотиды

ДМФ – N,N-диметилформаид

ДРС – динамического рассеяния света

ЗНЗ – золотые нанозвезды

КТ – квантовые точки

ЛФ – Липофектамин2000

мРНК – матричные РНК

миРНК – интерферирующие РНК

МЮ – модуль Юнга

НК – нуклеиновые кислоты

НМ – наноматериалы

НСт – золотые наностержни

НСф – золотые наносферы

НЧ – наночастицы

НЧЗ – наночастицы золота

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПВП – поливинилпиридин

ПИ – пропидий йодид

ПКП – проникающие в клетки пептиды

ПР – плазмонный резонанс

ПЦР – полимеразной цепной реакции

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭИ – полиэтиленимин

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТФ – Турбофлект

УНТ – углеродные нанотрубки

ФДА – флуоресцеин диацетат

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

ЦФ – центрифугирование

ЭМ – электронная микроскопия

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Stewart M.P., Langer R., Jensen K.F. Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts // *Chem. Rev.* – 2018. – Vol. 118. – P. 7409–7531.
- 2 Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy // *Chem. Rev.* – 2016. – Vol. 116. – P. 2826–2885.
- 3 Fernanda M., Fernando B. Jr. Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects // *J. Toxicol. Environ. Health B.* – 2016. – Vol.19 (3-4). – P. 129–48.
- 4 Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Multifunctional gold-based nanocomposites for theranostics // *Biomaterials.* – 2016. – Vol. 108. – P. 13–34.
- 5 Tiefenboeck P., Kim J.A., Leroux J.-C. Intracellular delivery of colloids: Past and future contributions from microinjection // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – V. 132. – P. 3–15.
- 6 Cao Y., Ma E., Cestellos-Blanco S., Zhang B., Qiu R., Su Y., Doudna J.A., Yang P. Nontoxic nanopore electroporation for effective intracellular delivery of biological macromolecules // *PNAS.* – 2019. – Vol.1 16 (16). – P. 7899–7904.
- 7 Horsley H., Owen J., Carugo D., Malone-Lee J., Stride E., Rohn J.L. Ultrasound-activated microbubbles as a novel intracellular drug delivery system for urinary tract infection // *J. Control. Release.* – 2019. – Vol. 301. – P. 166–175.
- 8 Schomaker M., Heinemann D., Kalies S., Willenbrock S., Wagner S., Nolte I., Ripken T., Escobar H.M., Meyer H., Heisterkamp A. Characterization of nanoparticle mediated laser transfection by femtosecond laser pulses for applications in molecular medicine // *J. Biophotonics.* – 2015. – Vol. 13. – P. 10.
- 9 Lachaine R., Boulais É., Meunier M. From thermo- to plasma-mediated ultrafast laser-induced plasmonic nanobubbles // *ACS Photonics.* – 2014. – Vol. 1 (4). – P. 331–336.
- 10 Garcia-Sanchez A., Marques-Garcia F. Gene silencing delivery methods: lipid-

mediated and electroporation transfection protocols // *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 1434. – P. 139–151.

11 Vanzha E., Pylaev T., Prilepskii A., Golubev A., Khlebtsov B., Bogatyrev V., Khlebtsov N. Cell culture surfaces with immobilized gold nanostars: a new approach for laser-induced plasmonic cell optoporation // *Proc. SPIE.* – 2017. – Art. No 10336.

12 Pylaev T., Vanzha E., Avdeeva E., Khlebtsov B., Khlebtsov N. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers // *J. Biophotonics.* – 2019. – Vol. 12. – Art. No e201800166.

13 Bisker G., Yelin D. Noble-metal nanoparticles and short pulses for nanomanipulations: theoretical analysis // *J. Opt. Soc. Am. B.* – 2012. – Vol. 29. – P. 1383–1393.

14 Kalies S., Birr T., Heinemann D., Schomaker M., Ripken T., Heisterkamp A., Meyer H. Enhancement of extracellular molecule uptake in plasmonic laser perforation // *J. Biophotonics.* – 2014. – Vol. 7. – P. 474–482.

15 Schomaker M., Killian D., Willenbrock S., Heinemann D., Kalies S., Ngezahayo A., Nolte I., Ripken T., Junghan C., Meyer H., Escobar H.M., Heisterkamp A. Biophysical effects in off resonant gold nanoparticle mediated (GNOME) laser transfection of cell lines, primary and stem cells using fs laser pulses // *J. Biophotonics.* – 2015. – Vol. 8. – P. 646–658.

16 Pöyhönen S., Er S., Domanskyi A., Airavaara M. Effects of neurotrophic factors in Glial cells in the central nervous system: expression and properties in neurodegeneration and injury // *Frontiers in Physiology.* – 2019. – Vol. 10. – Art. No 486.

17 Gan P., Patterson M., Sucov H.M. Cardiomyocyte Polyploidy and Implications for Heart Regeneration // *Annual Review of Physiology.* – 2019. – Vol. 82. – P. 45–61.

18 Sharifi N., Gharravi A.M. Shear bioreactors stimulating chondrocyte regeneration, a systematic review // *Inflamm Regener.* – 2019. – Vol. 39. – Art. No 16.

19 Khoo T.S., Jamal R., Abdul Ghani N.A., Alauddin H., Hussin N.H., Abdul Murad N.A. Retention of somatic memory associated with cell identity, age and metabolism

- in induced pluripotent stem (iPS) cells reprogramming.// Stem Cell Reviews and Reports. – 2020. – Vol. 16. – P. 251–261.
- 20 Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy // Diseases. – 2018. – Vol. 6 (2). – P. 42–62.
- 21 Schwarze S.R., Dowdy S.F. *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA // Trends in Pharm. Sci. – 2000. – Vol. 21 (2). – P. 45–48.
- 22 Juliano R.L., Carver K. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2015. – Vol. 87. – P. 35–45.
- 23 Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // J Embryol Exp Morphol. – 1962. – Vol. 10 (4). – P. 622–640.
- 24 Johnson M.H., Cohen J. Reprogramming rewarded: the 2012 Nobel prize for Physiology or Medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka // Reproductive biomedicine online. – 2012. – Vol. 25 (6). – P. 549–550.
- 25 Li Q., Qin Z., Wang Q., Xu T., Yang Y., He Z. Applications of genome editing technology in animal disease modeling and gene therapy // Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2019. – Vol. 17. – P. 689–698.
- 26 Prondzynski M., Lemoine M.D., Zech A.T., Horváth A., Di Mauro V., Koivumäki J.T., Carrier L. Disease modeling of a mutation in α -actinin 2 guides clinical therapy in hypertrophic cardiomyopathy // EMBO Mol. Med. – 2019. – Vol. 11. – Art. No e11115.
- 27 Erharter A., Rizzi S., Mertens J., Edenhofer F. Take the shortcut: Direct conversion of somatic cells into induced neural stem cells and their biomedical applications // FEBS Letters. – 2019. – Vol. 593. – P. 3353–3369.
- 28 Charpentier E., Doudna J.A. The CRISPR/Cas9 genetic scissors: the Nobel prize in Chemistry 2020 to Emmanuelle Charpentier and Jennifer A. Doudna // J Clin Invest. – 2020. – Vol. 17.
- 29 Catanese D.J., Fogg J.M., Schrock D.E., Gilbert B.E., Zechiedrich L. Supercoiled

minivector DNA resists shear forces associated with gene therapy delivery // *Gene Ther.* – 2012. – Vol. 19. – P. 94–100.

30 Hornstein B.D., Roman D., Arevalo-Soliz L.M., Engevik M.A., Zechiedrich L. Effects of circular DNA length on transfection efficiency by electroporation into hela cells // *PloS One.* – 2016. – Vol. 11. – Art. No e0167537.

31 Chabot S., Teissie J., Golzio M. Targeted electro-delivery of oligonucleotides for RNA interference: siRNA and antimiR // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2015. – Vol. 81. – P. 161–168.

32 Dowdy S.F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 222–229.

33 Ahmadzada T., Reid G., McKenzie D.R., Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer // *Biophys. Rev.* – 2018. – Vol. 10 (1). – P. 69–86.

34 Finch M.L., Marquardt J.U., Yeoh G.C., Callus B.A. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 54. – P. 288–303.

35 Islam M.A., Reesor E.K., Xu Y., Zope H.R., Zetter B.R., Shi J. Biomaterials for mRNA delivery // *Biomater. Sci.* – 2015. – Vol. 3. – P. 1519–1533.

36 Wang H.-X., Li M., Lee C.M., Chakraborty S., Kim H.-W., Bao G., Leong K.W. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery // *Chem. Rev.* – 2017. – Vol. 117. – P. 9874–9906.

37 Cox D.B., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges // *Nat. Med.* – 2015. – Vol. 21. – P. 121–131.

38 Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR/Cas9 // *Science.* – 2014. – Vol. 346. – P. 1258096.

39 Glass Z., Lee M., Li Y.M., Xu Q.B. Engineering the delivery system for CRISPR - based genome editing // *Trends Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36. – P. 173–185.

- 40 Liu J., Wen J., Zhang Z., Liu H., Sun Y. Voyage inside the cell: microsystems and nanoengineering for intracellular measurement and manipulation // *Microsystems & Nanoengineering*. – 2015. – Vol. 1. – P. 15020.
- 41 Chang L.Q., Hu J.M., Chen F., Chen Z., Shi J.F., Yang Z.G., Li Y.W., Lee L.J. Nanoscale bio-platforms for living cell interrogation: current status and future perspectives // *Nanoscale*. – 2016. – Vol. 8. – P. 3181–3206.
- 42 Lakhin A.V., Tarantul V.Z., Gening L.V. Aptamers: problems, solutions and prospects // *Acta Naturae*. – 2013. – Vol. 5 (4). – P. 34–43.
- 43 Keefe A.D., Pai S., Ellington A. Aptamers as therapeutics // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9. – P. 537–550.
- 44 Šponer J., Bussi G., Krepl M., Banáš P., Bottaro S., Cunha R.A., Gil-Ley A., Pinamonti G., Pobleto S., Jurečka P., Walter N.G., Otyepka M. RNA structural dynamics as captured by molecular simulations: a comprehensive overview // *Chem. Rev.* – 2018. – Vol. 118 (8). – P. 4177–4338.
- 45 Wang Y., Yang J., Yuan X., Cao J., Xu J., Chaput J.C., Li Z., Yu H. A novel small RNA-cleaving deoxyribozyme with a short binding arm // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 8224.
- 46 Zhang Y., Røise J.J., Lee K., Li J., Murthy N. Recent developments in intracellular protein delivery // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 52. – P. 25–31.
- 47 Lederberg J. Cell genetics and hereditary symbiosis // *Physiol. Rev.* – 1952. – Vol. 32. – P. 403–430.
- 48 Cohen S.N. DNA cloning: a personal view after 40 years // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – Vol. 110. – P. 15521–15529.
- 49 Ausubel L.J., Hall C., Sharma A., Shakeley R., Lopez P., Quezada V., Couture S., Laderman K., McMahon R., Huang P., Hsu D., Couture L. Production of CGMP-grade lentiviral vectors // *Bioprocess Int.* – 2012. – Vol. 10 (2). – P. 32–43.
- 50 Agirre M., Zarate J., Ojeda E., Puras G., Rojas L.A., Alemany R., Pedraz J.L. Delivery of an adenovirus vector plasmid by ultrapure oligochitosan based polyplexes // *Int. J. Pharm.* – 2015. – Vol. 479 (2). – P. 312–319.

- 51 Heming J.D., Conway J.F., Homa F.L. Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* – 2017. – Vol. 223. – P. 119–142.
- 52 Zarrouk K., Piret J., Boivin G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors // *Virus Research.* – 2017. – Vol. 234. – P. 177–192.
- 53 Tsoi M., Do T.T., Tang V., Aguilera J.A., Perry C.C., Milligan J.R. Characterization of condensed plasmid DNA models for studying the direct effect of ionizing radiation // *Biophys. Chem.* – 2010. – Vol. 147. – P. 104–110.
- 54 Salganik M., Hirsch M.L., Samulski R.J. Adeno-associated virus as a mammalian DNA vector // *Microbiol Spectr.* – 2015. – Vol. 3 (4). – P. 1–32.
- 55 Guimaro M.C., Afione S.A., Tanaka T., Chiorini J.A. Rescue of adeno-associated virus production by shRNA cotransfection // *Hum. Gene Ther.* – 2020. – Vol. 31. – P. 19–20.
- 56 Lundin K.E., Gissberg O., Smith C.I.E. Oligonucleotide therapies: the past and the present // *Hum. Gene Ther.* – 2015. – Vol. 26. – P. 475–485.
- 57 Jackson D.A., Berg P., Symons R.H. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and galactose operon of *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1972. – Vol. 69. – P. 2904–2909.
- 58 Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., Helling R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1973. – Vol. 70. – P. 3240–3244.
- 59 Stephenson M.L.; Zamecnik P.C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1978. – Vol. 75. – P. 285–288.
- 60 Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans* // *Nature.* – 1998. – Vol. 391. – P. 806–811.
- 61 Brachet J., Huez G., Hubert E. Microinjection of rabbit hemoglobin messenger-RNA into amphibian oocytes and embryos // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1973. –

Vol. 70. – P. 543–547.

62 Woodland H.R., Gurdon J.B., Lingrel J.B. The translation of mammalian globin mRNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*: II. The distribution of globin synthesis in different tissues // *Dev. Biol.* – 1974. – Vol. 39. – P. 134–140.

63 Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands // *Nature.* – 1990. – Vol. 346. – P. 818–822.

64 Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science.* – 1990. – Vol. 249. – P. 505–510.

65 Woese C. The genetic code: the molecular basis for genetic expression // C. Woese. – New York: Harper and Row. – 1967.

66 Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate rna interference in cultured mammalian cells // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 494–498.

67 Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C-elegans* heterochronic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14* // *Cell.* – 1993. – Vol. 75. – P. 843–854.

68 Schroeder A., Levins C.G., Cortez C., Langer R., Anderson D.G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery // *J. Intern. Med.* – 2010. – Vol. 267. – P. 9–21.

69 Crooke S.T., Wang S., Vickers T.A., Shen W., Liang X.H. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 230–237.

70 Barrett L.E., Sul J.Y., Takano H., Van Bockstaele E.J., Haydon P.G., Eberwine J.H. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor // *Nat. Methods.* – 2006. – Vol. 3. – P. 455–460.

71 Kauffman K.J., Webber M.J., Anderson D.G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics // *J. Controlled Release.* – 2016. – Vol. 240. – P. 227–234.

72 Kranz L.M., Diken M., Haas H., Kreiter S., Loquai C., Reuter K.C., Meng M., Fritz

- D., Vascotto F., Hefesha H. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy // *Nature*. – 2016. – Vol. 534. – P. 396–401.
- 73 Kormann M.S.D., Hasenpusch G., Aneja M.K., Nica G., Flemmer A.W., Herber-Jonat S., Huppmann M., Mays L.E., Illenyi M., Schams A. et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 154–157.
- 74 Gopal A., Zhou Z.H., Knobler C.M., Gelbart W.M. Visualizing large RNA molecules in solution // *RNA*. – 2012. – Vol. 18. – P. 284–299.
- 75 Aderem A., Underhill D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 593–623.
- 76 Schmid S.L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process // *Annu. Rev. Biochem.* – 1997. – Vol. 66. – P. 511–548.
- 77 Conner S.D., Schmid S.L. Regulated portals of entry into the cell // *Nature*. – 2003. – Vol. 422. – P. 37–44.
- 78 Swanson J.A., Watts C. Macropinocytosis // *Trends Cell Biol.* – 1995. – Vol. 5. – P. 424–428.
- 79 Yao J., Fan Y., Li Y., Huang L. Strategies on the nuclear-targeted delivery of genes // *J. Drug Target.* – 2013. – Vol. 21. – P. 926–939.
- 80 Hill A.B., Chen M., Chen C.-K., Pfeifer B.A., Jones C.H. Overcoming gene-delivery hurdles: physiological considerations for nonviral vectors // *Trends Biotechnol.* – 2016. – Vol. 34. – P. 91–105.
- 81 Lai W.-F., Wong W.-T. Design of polymeric gene carriers for effective intracellular delivery // *Trends Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36. – P. 713–728.
- 82 Stewart M.P., Sharei A., Ding X., Sahay G., Langer R., Jensen K.F. *In vitro* and *ex vivo* strategies for intracellular delivery // *Nature*. – 2016. – Vol. 538 (7624). – P. 183–192.
- 83 Richter C., Chang J.T., Fineran P.C. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR Associated (Cas)

Systems // Viruses. – 2012. – Vol. 4 (10). – P. 2291–2311.

84 Mollanoori H., Teimourian S. Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy // Biotechnol. Lett. – 2018. – Vol. 40 (6). – P. 907–914.

85 Duan Y., Ma G., Huang X., D'Amore P.A., Zhang F., Lei H. The CRISPR/CAS9-created *MDM2* T309G enhances vitreous-induced expression of *MDM2* and proliferation and survival of cells // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291 (31). – P. 16339–16347.

86 Chira S., Gulei D., Hajitou A., Zimta A.A., Cordelier P., BerindanNeagoe I. CRISPR/Cas9: transcending the reality of genome editing // Mol. Ther. Nucl. Acids. – 2017. – Vol. 7. – P. 211–222.

87 Ren J., Zhao Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9 // Protein Cell. – 2017. – Vol. 8. – P. 634–643.

88 Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery // Elife. – 2014. – Vol. 3. – Art. No e04766.

89 Gibson G.J., Yang M. What rheumatologists need to know about CRISPR/Cas9 // Nat. Rev. Rheumatol. – 2017. – Vol. 13. – P. 205–216.

90 Mitomo K., Griesenbach U., Inoue M., Somerton L., Meng C., Akiba E., Tabata T., Ueda Y., Frankel G.M., Farley R., Singh C., Chan M., Munkonge F., Brum A., Xenariou S., Escudero-Garcia S., Hasegawa M., Alton E.W. Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with *Sendai virus* envelopes // Mol. Ther. – 2010. – Vol. 18. – P. 1173–82.

91 Yang Z.R., Wang H.F., Zhao J., Peng Y.Y., Wang J., Guinn B.A., Huang L.Q. Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy // Cancer Gene Ther. – 2007. – Vol. 14. – P. 599–615.

92 Ma Y., Nolte R.J., Cornelissen J.J. Virus-based nanocarriers for drug delivery // Adv. Drug Delivery Rev. 2012. – Vol. 64. – P. 811–825.

93 Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy // Nat. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 4. – P. 346–358.

- 94 Kay M.A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead // Nat. Rev. Genet. – 2011. – Vol. 12. – P. 316–328.
- 95 Wang I.-H., Burckhardt C., Yakimovich A., Greber U. Imaging, tracking and computational analyses of virus entry and egress with the cytoskeleton // Viruses. – 2018. – Vol. 10 (4). – Art. No E166.
- 96 Bordet T., Behar-Cohen F. Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives // Drug Discov. Today. – 2019. – Vol. 24. – P. 1685–1693.
- 97 Li C., Samulski R.J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy // Nat. Rev. Genet. – 2020. – Vol. 21. – P. 255–272.
- 98 Sun Y., Lv X., Ding P., Wang L., Sun Y., Li S., Zhang H., Gao Z. Exploring the functions of polymers in adenovirus-mediated gene delivery: Evading immune response and redirecting tropism // Acta Biomat. – 2019. – Vol. 97 (1). – P. 93–104.
- 99 Chu S., Brown A.D., Culver J.N., Ghodssi R. Tobacco mosaic virus as a versatile platform for molecular assembly and device fabrication // Biotech. J. – 2018. – Art. No 1800147.
- 100 Buchholz C.J., Friedel T., Büning H. Surface-engineered viral vectors for selective and cell type-specific gene delivery // Trends Biotechnol. – 2015. – Vol. 33. – P. 777–790.
- 101 Hochstein R., Bollschweiler D., Dharmavaram S., Lintner N.G., Plitzko J.M., Bruinsma R., Engelhardt H., Young M.J., Klug W.S., Lawrence C.M. Structural studies of *Acidianustailed* spindle virus reveal a structural paradigm used in the assembly of spindle-shaped viruses // PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2018. – Vol. 115 (9). – P. 2120–2125.
- 102 Konishi M., Kawamoto K., Izumikawa M., Kuriyama H., Yamashita T. Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors // J. Gene Med. – 2008. – Vol. 10. – P. 610–618.
- 103 Kim S., Federman N., Gordon E.M., Hall F.L., Chawla S.P. Rexin-G®, a tumor-targeted retrovector for malignant peripheral nerve sheath tumor: A case report // Mol. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 6 (6). – P. 861–865.

- 104 Andtbacka R.H.I., Kaufman H.L., Collichio F., Amatruda T., Senzer N., Chesney J., Delman K.A., Spitler L.E., Puzanov I., Agarwala S.S., et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 58. – Art. No 3377.
- 105 Lundstrom K., Boulikas T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2003. – Vol. 2. – P. 471–485.
- 106 Misra S. Human gene therapy: A brief overview of the genetic revolution // *J. Assoc. Physicians India.* – 2013. – Vol. 61. – P. 127–133.
- 107 Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2005. – Vol. 4. – P. 581–593.
- 108 Tros de Ilarduya C., Sun Y., Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol. 40 (3). – P. 159–170.
- 109 Buck J., Grossen P., Cullis P.R., Huwyler J., Witzigmann D. Lipid-based DNA therapeutics: hallmarks of non-viral gene delivery // *ACS Nano.* – 2019. – Vol. 13 (4). – P. 3754–3782.
- 110 Graham F.L., van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // *Virology.* – 1973. – Vol. 52. – P. 456–467.
- 111 Hattori Y., Hu S., Onishi H. Effects of cationic lipids in cationic liposomes and disaccharides in the freeze-drying of siRNA lipoplexes on gene silencing in cells by reverse transfection // *Journal of Liposome Research.* – 2019. – Vol. 30. – P. 1–33.
- 112 Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 7413–7417.
- 113 De Jesus M.B., Zuhorn I.S. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms // *J. Control. Release.* – 2015. – Vol. 201. – P. 1–13.
- 114 Del Pozo-Rodríguez A., Solinís M.Á., Rodríguez-Gascón A. Applications of lipid

nanoparticles in gene therapy // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2016. – Vol. 109. – P. 184–193.

115 Zatspein T.S., Kotelevtsev Y.V., Koteliansky V. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery – going from bench to bedside // *Int. J. Nanomedicine.* – 2016. – Vol. 11. – P. 3077–3086.

116 Sahay G., Alakhova D.Y., Kabanov A.V. Endocytosis of nanomedicines // *J. Control. Release.* – 2010. – Vol. 145. – P. 182–195.

117 Gilleron J., Querbes W., Zeigerer A., Borodovsky A., Marsico G., Schubert U., et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 638–646.

118 Belting M., Sandgren S., Wittrup A. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2005. – Vol. 57 (4). – P. 505–527.

119 Bischofberger M., Iacovache I., van der Goot F.G. Pathogenic pore-forming proteins: function and host response // *Cell Host Microbe.* – 2012. – Vol. 12. – P. 266–275.

120 Munyendo W.L., Lv H., Benza-Ingoula H., Baraza L.D., Zhou J. Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals // *Biomolecules.* – 2012. – Vol. 2. – P. 187–202.

121 Alhakamy N.A., Nigatu A.S., Berkland C.J., Ramsey J.D. Noncovalently associated cell-penetrating peptides for gene delivery applications // *Ther. Deliv.* – 2013. – Vol. 4. – P. 741–757.

122 Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins // *Genome Res.* – 2014. – Vol. 24. – P. 1012–1019.

123 Ita K. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2020. – Vol. 150. – Art. No 105358.

124 Aggarwal R., Targhotra M., Kumar B., Sahoo P.K., Chauhan M.K. Polyplex: a promising gene delivery system // *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* – 2019. – Vol. 12. – P. 4681–4686.

- 125 Zhao J., Ullah I., Gao B., Guo J., Ren X.-K., Xia S., Zhang W., Feng Y. Agmatine-grafted bioreducible poly(L-lysine) for gene delivery with low cytotoxicity and high efficiency // *J. Mater. Chem. B.* – 2020. – Vol. 8. – P. 2418–2430.
- 126 Zarei H., Kazemi Oskuee R., Hanafi-Bojd M.Y., Gholami L., Ansari L., Malaekheh-Nikouei B. Enhanced gene delivery by polyethyleneimine coated mesoporous silica nanoparticles // *Pharm. Dev. Technol.* – 2018. – Vol. 24. – P. 1–6.
- 127 Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. Non-viral vectors for gene-based therapy // *Nat. Rev. Genet.* – 2014. – Vol. 15. – P. 541–555.
- 128 Da Silva J., Jesus S., Bernardi N., Colaço M., Borges O. Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticle size reduction increases its immunotoxicity // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – Art. No 137.
- 129 Chuan D., Jin T., Fan R., Zhou L., Guo G. Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2019. – Vol. 268. – P. 25–38.
- 130 Matulis D., Rouzina I., Bloomfield V.A. Thermodynamics of DNA binding and condensation: Isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 296. – P. 1053–1063.
- 131 Sharma D., Arora S., dos Santos Rodrigues B., Lakkadwala S., Banerjee A., Singh J. Chitosan-Based Systems for Gene Delivery // *Jana Functional Chitosan / S. Jana, S. (eds.).* – Springer, 2019. – P. 229–268.
- 132 Li T., Yang M. Vesicle trafficking, autophagy and nanoparticles: A brief review // *Current Nanomedicine, Current Nanomedicine (Formerly: Recent Patents on Nanomedicine).* – 2020. – Vol. 10 (17). – P. 3-19.
- 133 Farris E., Brown D.M., Ramer-Tait A.E., Pannier A.K. Micro- and nanoparticulates for DNA vaccine delivery // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2016. – Vol. 241. – P. 919–929.
- 134 Xu H., Li Z., Si J. Nanocarriers in gene therapy: A review // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2014. – Vol. 10. – P. 3483–3507.

- 135 Guo K., Zhao X., Dai X., Zhao N., Xu F.-J. Organic/inorganic nanohybrids as multifunctional gene delivery systems // *J. Gene Med.* – 2019. – Vol. 21 (5). – Art. No e3084.
- 136 Luther J.M., Jain P.K., Ewers T., Alivisatos A.P. Localized surface plasmon resonances arising from free carriers in doped quantum dots // *Nat. Mater.* – 2011. – Vol. 10 (5). – P. 361–366.
- 137 Niut Y., Popatt A., Yu M., Karmakar S., Gu W., Yu C. Recent advances in the rational design of silica-based nanoparticles for gene therapy // *Ther. Deliv.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1217–1237.
- 138 Luo X., Peng X., Hou J., Wu S., Shen J., Wang L. Folic acidfunctionalized polyethylenimine superparamagnetic iron oxide nanoparticles as theranostic agents for magnetic resonance imaging and PD-L1 siRNA delivery for gastric cancer // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 5331–5343.
- 139 Liu W.J., Zhu Z.N., Deng K., Li Z.T., Zhou Y.L., Qiu H.B., Gao Y., Che S.N., Tang Z.Y. Gold nanorod@chiral mesoporous silica core-shell nanoparticles with unique optical properties // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135 (26). – P. 9659–9664.
- 140 Kumar R., Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Vathy L.A., Bergey E.J., Sajjad M., Prasad P.N. *In vivo* biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles // *ACS Nano.* – 2010. – Vol. 4 (2). – P. 699–708.
- 141 Molaei M.J. Carbon quantum dots and their biomedical and therapeutic applications: a review // *RSC Advances.* – 2019. – Vol. 9. – P. 6460–6481.
- 142 Mokhtarzadeh A., Vahidnezhad H., Youssefian L., Mosafer J., Baradaran B., Uitto J. Applications of spherical nucleic acid nanoparticles as delivery systems // *Trends in Molecular Medicine.* – 2019. – Vol. 25. – P. 1066–1079.
- 143 Guo L., Chen L., Hong S., Kim D.-H. Single plasmonic nanoparticles for ultrasensitive DNA sensing: From invisible to visible // *Biosens.Bioelectron.* – 2016. – Vol. 79. – P. 266–272.
- 144 Zhu X., Li J., He H., Huang M., Zhang X., Wang S. Application of nanomaterials

in the bioanalytical detection of disease-related genes // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – Vol. 74. – P. 113–133.

145 Chinen A.B., Guan C.M., Ferrer J.R., Barnaby S.N., Merkel T.J., Mirkin C.A. Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence // *Chem. Rev.* – 2015. – Vol. 115. – P. 10530–10574.

146 Wang S., Chen Y., Wang S., Li P., Mirkin C.A., Farha O.K. DNA-functionalized metal–organic framework nanoparticles for intracellular delivery of proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 2019. – Vol. 141 (6). – P. 2215–2219.

147 Huschka R., Barhoumi A., Liu Q., Roth J.A., Ji L., Halas N.J. Gene silencing by gold nanoshell-mediated delivery and laser-triggered release of antisense oligonucleotide and siRNA // *ACS Nano.* – 2012. – Vol. 6. – P. 7681–7691.

148 Tayier B., Deng Z., Wang Y., Wang W., Mu Y., Yan F. Biosynthetic nanobubbles for targeted gene delivery by focused ultrasound // *Nanoscale.* – 2019. – Vol. 11. – P. 14757–14768.

149 Berry C.C. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2009. – Vol. 42 (22). – Art. No 224003.

150 Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M. Polymeric systems for controlled drug release // *Chem. Rev.* – 1999. – Vol. 99 (11). – P. 3181–3198.

151 Wei H., Cheng S.X., Zhang X.Z., Zhuo R.X. Thermosensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers // *Prog. Polym. Sci.* – 2009. – Vol. 34 (9). – P. 893–910.

152 Yavuz M. S., Cheng Y.Y., Chen J.Y., Cogley C.M., Zhang Q., Rycenga M., Xie J.W., Kim C., Song K.H., Schwartz A.G., et al. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light // *Nat. Mater.* – 2009. – Vol. 8 (12). – P. 935–939.

153 Schumers J.M., Fustin C.A., Gohy J.F. Light-responsive block copolymers. *Macromol // Rapid Commun.* – 2010. – Vol. 31 (18). – P. 1588–1607.

154 Chronopoulou L., Massimi M., Giardi M.F., Cametti C., Devirgiliis L.C., Dentini

M., Palocci C. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures // *Colloids Surf. B.* – 2013. – Vol. 103. – P. 310–317.

155 Tassa C., Shaw S.Y., Weissleder R. Dextran-Coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy // *Acc. Chem. Res.* – 2011. – Vol. 44 (10). – P. 842–852.

156 Grayson S.M., Frechet J.M.J. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications // *Chem. Rev.* – 2001. – Vol. 101 (12). – P. 3819–3867.

157 Kesharwani P., Gothwal A., Iyer A.K., Jain K., Chourasia M.K., Gupta U. Dendrimer nanohybrid carrier systems: an expanding horizon for targeted drug and gene delivery // *Drug Discov. Today.* – 2018. – Vol. 23 (2). – P. 300–314.

158 Hong G.S., Diao S., Chang J.L., Antaris A.L., Chen C.X., Zhang B., Zhao S., Atochin D.N., Huang P.L., Andreasson K.I., Kuo C.J., Dai H. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new nearinfrared window // *Nat. Photonics* – 2014. – Vol. 8 (9). – P. 723–730.

159 Pantarotto D., Singh R., McCarthy D., Erhardt M., Briand J.-P., Prato M., Kostarelos K., Bianco A. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2004. – Vol. 43. – P. 5242–5246.

160 Han T., Nag A., Chandra Mukhopadhyay S., Xu Y. Carbon Nanotubes and its gas-sensing applications: A Review // *Sens. Actuator A Phys.* – 2019. – Vol. 291. – P. 107–143.

161 Zhu S.J. Meng Q.N. Wang L., Zhang J.H., Song Y.B., Jin H., Zhang K., Sun H.C., Wang H.Y., Yang B. Highly Photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2013. – Vol. 52 (14). – P. 3953–3957.

162 Ding H., Cheng L.W., Ma Y.Y., Kong J.L., Xiong H.M. Luminescent carbon quantum dots and their application in cell imaging // *New J. Chem.* – 2013. – Vol. 37 (8). – P. 2515–2520.

163 Ye R.Q., Xiang C.S., Lin J., Peng Z.W., Huang K.W., Yan Z., Cook N.P., Samuel E.L.G., Hwang C.C., Ruan G.D., Ceriotti G., Raji A.-R.O., Martí A.A., Tour J.M. Coal

as an abundant source of graphene quantum dots // *Nat. Commun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 2943.

164 Yan X., Cui X., Li L.S. Synthesis of large, stable colloidal graphene quantum dots with tunable size // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132 (17). – P. 5944–5945.

165 Bloom M., Evans E., Mouritsen O.G. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective // *Q. Rev. Biophys.* – 1991. – Vol. 24. – P. 293–397.

166 Hallow D.M., Seeger R.A., Kamaev P.P., Prado G.R., LaPlaca M.C., Prausnitz M.R. Shear-induced intracellular loading of cells with molecules by controlled microfluidics // *Biotechnol. Bioeng.* – 2008. – Vol. 99. – P. 846–854.

167 Borle A. B., Snowdowne K.W. Measurement of intracellular free calcium in monkey kidney cells with aequorin // *Science.* – 1982. – Vol. 217. – P. 252–254.

168 Groulx N., Boudreault F., Orlov S.N., Grygorczyk R. Membrane reserves and hypotonic cell swelling // *J. Membr. Biol.* – 2006. – Vol. 214. – P. 43–56.

169 Barber M.A. A technic for the inoculation of bacteria and other substances into living cells // *J. Infect. Dis.* – 1911. – Vol. 8 (3). – P. 348–360.

170 Anderson W.F., Killoos L., Sanders-Haigh L., Kretschmer P.J., Diacumakos E.G. Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1980. – Vol. 77. – P. 5399–5403.

171 Xu W. Microinjection and Micromanipulation: A Historical Perspective // *Microinjection.* – 2018. – Vol. 1874. – P. 1–16.

172 Weaver J.C., Chizmadzhev Y.A. Theory of electroporation: a review // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1996. – Vol. 41. – P. 135–160.

173 Kandušer M., Miklavc̃iĉ D. Electroporation in biological cell and tissue: an overview Ch. 1, 1–37 // *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials* / E.Vorobiev, N. Lebovka (eds.). – Springer, 2008.

174 Canatella P., Prausnitz M. Prediction and optimization of gene transfection and drug delivery by electroporation // *Gene Ther.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1464–1469.

- 175 Xiong R., Samal S.K., Demeester J., Skirtach A.G., De Smedt S.C., Braeckmans K. Laser-assisted photoporation: fundamentals, technological advances and applications // *Adv. Phys.:* X. – 2016. – Vol. 1. – P. 596–620.
- 176 Wayteck L., Xiong R., Braeckmans K., De Smedt S.C., Raemdonck K. Comparing photoporation and nucleofection for delivery of small interfering RNA to cytotoxic T cells // *J. Control. Release.* – 2017. – Vol. 267. – P. 154–162.
- 177 Courvoisier S., Saklayen N., Huber M., Chen J., Diebold E.D., Bonacina L., Wolf J.-P., Mazur E. Plasmonic tipless pyramid arrays for cell poration // *Nano Lett.* – 2015. – Vol. 15 (7). – P. 4461–4466.
- 178 Lyu Z., Zhou F., Liu Q., Xue H., Yu Q., Chen H. A Universal platform for macromolecular delivery into cells using gold nanoparticle layers via the photoporation effect // *Adv. Funct. Mater.* – 2016. – Vol. 26 (32). – P. 5787–5795.
- 179 Tsukakoshi M., Kurata S., Nomiya Y., Ikawa Y., Kasuya T. A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery // *Appl. Phys. B.* – 1984. – Vol. 35. – P. 135–140.
- 180 Kurata S.-I., Tsukakoshi M., Kasuya T., Ikawa Y. The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells // *Exp. Cell Res.* – 1986. – Vol. 162. – P. 372–378.
- 181 Tao W., Wilkinson J., Stanbridge E.J., Berns M.W. Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 4180–4184.
- 182 Tirlapur U.K., König K. Targeted transfection by femtosecond laser // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 290–291.
- 183 Clark I., Hanania E.G., Stevens J., Gallina M., Fieck A., Brandes R., Palsson B.O., Koller M.R. Optoinjection for efficient targeted delivery of a broad range of compounds and macromolecules into diverse cell types // *J. Biomed. Opt.* – 2006. – Vol. 11. – Art. No 014034.
- 184 Lei M., Xu H., Yang H., Yao B. Femtosecond laser-assisted microinjection into living neurons // *J. Neurosci. Methods.* – 2008. – Vol. 174. – P. 215–218.

- 185 Uchugonova A., König K., Bueckle R., Isemann A., Tempea G. Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses // *Opt. Express.* – 2008. – Vol. 16. – P. 9357–9364.
- 186 Hosokawa Y., Ochi H., Iino T., Hiraoka A., Tanaka M. Photoporation of biomolecules into single cells in living vertebrate embryos induced by a femtosecond laser amplifier // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – Art. No e27677.
- 187 Rendall H.A., Marchington R.F., Praveen B.B., Bergmann G., Arita Y., Heisterkamp A., Gunn-Moore F.J., Dholakia K. High-throughput optical injection of mammalian cells using a Bessel light beam // *Lab Chip.* – 2012. – Vol. 12. – P. 4816–4820.
- 188 Wu J., Xue H., Lyu Z., Li Z., Qu Y., Xu Y., Wang L., Yu Q., Chen H. Intracellular delivery platform for “Recalcitrant” cells: when polymeric carrier marries photoporation // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – Vol. 9 (26). – P. 21593–21598.
- 189 Lapotko D. Plasmonic nanoparticle-generated photothermal bubbles and their biomedical applications // *Nanomedicine.* – 2009. – Vol. 4. – P. 813–845.
- 190 Lukianova-Hleb E.Y., Belyanin A., Kashinath S., Wu X., Lapotko D.O. Plasmonic nanobubble-enhanced endosomal escape processes for selective and guided intracellular delivery of chemotherapy to drug-resistant cancer cells // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – P. 1821–1826.
- 191 Lapotko D. Plasmonic nanobubbles as tunable cellular probes for cancer theranostics // *Cancers.* – 2011. – Vol. 3. – P. 802–840.
- 192 Lukianova-Hleb E.Y., Mutonga M.B., Lapotko D.O. Cell-specific multifunctional processing of heterogeneous cell systems in a single laser pulse treatment // *ACS Nano.* – 2012. – Vol. 6. – P. 10973–10981.
- 193 Xiong R., Joris F., Liang S., De Rycke R., Lippens S., Demeester J., Skirtach A., Raemdonck K., Himmelreich U., De Smedt S.C. Cytosolic delivery of nanolabels prevents their asymmetric inheritance and enables extended quantitative *in vivo* cell imaging // *Nano Lett.* – 2016. – Vol. 16. – P. 5975–5986.

- 194 Xiong R., Verstraelen P., Demeester J., Skirtach A.G., Timmermans J.-P., De Smedt S.C., De Vos W.H., Braeckmans K. Selective labeling of individual neurons in dense cultured networks with nanoparticle-enhanced photoporation // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – Art. No 80.
- 195 Chakravarty P., Lane C.D., Orlando T.M., Prausnitz M.R. Parameters affecting intracellular delivery of molecules using laser-activated carbon nanoparticles // *Nanomedicine.* – 2016. – Vol. 12(4). – P. 1003–1011.
- 196 Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahnen-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // *Small.* – 2007. – Vol. 3. – P. 1941–1949.
- 197 Schaeublin N.M., Braydich-Stolle L.K., Schrand A.M., Miller J.M., Hutchison J., Schlager J.J., Hussain S.M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity // *Nanoscale.* – 2011. – Vol. 3. – P. 410–420.
- 198 Boulais E., Lachaine R., Meunier M. Plasma mediated off-resonance plasmonic enhanced ultrafast laser-induced nanocavitation // *Nano Lett.* – 2012. – Vol. 12. – P. 4763–4769.
- 199 Liu J., Xiong R., Brans T., Lippens S., Parthoens E., Zancchi F.C., Magrassi R., Singh S.K., Kurungot S., Szunerits S. Repeated photoporation with graphene quantum dots enables homogeneous labeling of live cells with extrinsic markers for fluorescence microscopy // *Light: Sci. Appl.* – 2018. – Vol. 7. – P. 47–57.
- 200 Lestrell E., Patolsky F., Voelcker N.H., Elnathan R. Engineered nano-bio interfaces for intracellular delivery and sampling: Applications, agency and artefacts // *Materials Today.* – 2019. – Vol. 33. – P. 87–104.
- 201 Wu Y.-C., Wu T.-H., Clemens D.L., Lee B.-Y., Wen X., Horwitz M.A., Teitell M.A., Chiou P.-Y. Massively parallel delivery of large cargo into mammalian cells with light pulses // *Nat. Methods.* – 2015. – Vol. 12. – P. 439–444.
- 202 Madrid M., Saklayen N., Shen W., Huber M., Vogel N., Mazur E. Laser-activated self-assembled thermoplasmonic nanocavity substrates for intracellular delivery // *ACS Appl. Bio Mater.* – 2018. – Vol. 1. – P. 1793–1799.

- 203 Wang L., Wu J., Hu Y., Hu C., Pan Y., Yu Q., Chen H. Using porous magnetic iron oxide nanomaterials as a facile photoporation nanoplatform for macromolecular delivery // *J. Mater. Chem. B.* – 2018. – Vol. 6. – P. 4427–4436.
- 204 Saklayen N., Huber M., Madrid M., Nuzzo V., Vulis D.I., Shen W., Nelson J., McClelland A.A., Heisterkamp A., Mazur E. Intracellular delivery using nanosecond-laser excitation of large-area plasmonic substrates // *ACS Nano.* – 2017. – Vol. 11. – P. 3671–3680.
- 205 Messina G.C., Dipalo M., La Rocca R., Zilio P., Caprettini V., Proietti Zaccaria R., Toma A., Tantussi F., Berdondini L., De Angelis F. Spatially, temporally, and quantitatively controlled delivery of broad range of molecules into selected cells through plasmonic nanotubes // *Adv. Mater.* – 2015. – Vol. 27. – P. 7145–7149.
- 206 Cooper S.T., McNeil P.L. Membrane repair: mechanisms and pathophysiology // *Physiol. Rev.* – 2015. – Vol. 95. – P. 1205–1240.
- 207 Manna M., Nieminen T., Vattulainen I. Understanding the role of lipids in signaling through atomistic and multiscale simulations of cell membranes // *Annu. Rev. Biophys.* – 2019. – Vol. 48 (1). – P. 421-439.
- 208 Wang H., Jiang Y., Peng H., Chen Y., Zhu P., Huang Y. Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 81. – P. 142–160.
- 209 Oliveira C., Ribeiro A.J., Veiga F., Silveira I. Recent advances in nucleic acid-based delivery: from bench to clinical trials in genetic diseases // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2016. – Vol. 12. – P. 841–862.
- 210 Rezaee M., Oskuee R.K., Nassirli H., Malaekheh-Nikouei B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems // *J. Control. Release.* – 2016. – Vol. 236. – P. 1–14.
- 211 Elkin S.R., Lakoduk A.M., Schmid, S.L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer // *Wien. Med. Wochenschr.* – 2016. – Vol. 166. – P. 196–204.
- 212 Rabia M., Leuzy V., Soulage C., Durand A., Fourmaux B., Errazuriz-Cerda E., Köffel R., Draeger A., Colosetti P., Jalabert A., Di Filippo M., Villard-Garon A.,

- Bergerot C., Luquain-Costaz C., Moulin P., Rome S., Delton I., Hullin-Matsuda F. Bis(monoacylglycero)phosphate, a new lipid signature of endosome-derived extracellular vesicles // *Biochimie.* – 2020. – Vol. 178. – P. 26–38.
- 213 Graczyk A., Pawlowska R., Jedrzejczyk D., Chworos A. Gold nanoparticles in conjunction with nucleic acids as a modern molecular system for cellular delivery // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25 (1). – Art. No 204.
- 214 Perez Ruiz de Garibay A. Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors // *Wien. Med. Wochenschr.* – 2016. – Vol. 1946. – P. 227–235.
- 215 Xiang S., Tong H., Shi Q., Fernandes J.C., Jin T., Dai K., Xiaoling Z. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery // *J. Control. Release.* – 2012. – Vol. 158. – P. 371–378.
- 216 Kopatz I., Remy J.-S., Behr J.-P. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin // *J. Gene Med.* – 2004. – Vol. 6. – P. 769–776.
- 217 Bai H., Lester G.M.S., Petishnok L.C., Dean D.A. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA // *Biosci. Rep.* – 2017. – Vol. 37 (6). – Art. No BSR20160616.
- 218 Juliano R.L. Intracellular trafficking and endosomal release of oligonucleotides: what we know and what we don't // *Nucleic Acid Ther.* – 2018. – Vol. 28. – Art. No. 3.
- 219 Gitlin L., Andino R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 7159–7165.
- 220 Park C., Peng C., Brennan G., Rothenburg S. Species-specific inhibition of antiviral protein kinase R by capripoxviruses and vaccinia virus // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2019. – Vol. 1438. – P. 1–12.
- 221 Rejman J., Bragonzi A., Conese M. Role of clathrin- and caveola-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes // *Mol. Ther.* – 2005. – Vol. 12. – P. 468–474.
- 222 Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., Kartenbeck J., Hayer A., Helenius A.

Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85. – P. 4198–4211.

223 Sakaguchi N., Kojima C., Harada A., Koiwai K., Emi N., Kono K. Effect of transferrin as a ligand of pH-sensitive fusogenic liposome-lipoplex hybrid complexes // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – P. 1588–1595.

224 Trusov G.A., Ulasov A.V., Beletkaia E.A., Khramtsov Y.V., Durymanov M.O., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Investigation of transport and unpacking mechanisms of polyplexes for transfection efficacy on different cell lines // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2011. – Vol. 437. – P. 77–79.

225 Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy // *Mol. Ther.* – 2011. – Vol. 19. – P. 103–112.

226 Zhang W., Rödl W., He D., Döblinger M., Lächelt U., Wagner E. Combination of sequence-defined oligoaminoamides with transferrin-polycation conjugates for receptor-targeted gene delivery // *J. Gene Med.* – 2015. – Vol. 17. – P. 161–172.

227 Mohammed-Saeid W., Chitanda J., Al-Dulaymi M., Verrall R., Badea I. Design and evaluation of RGD-modified gemini surfactant-based lipoplexes for targeted gene therapy in melanoma model // *Pharm. Res.* – 2017. – Vol. 34. – P. 1886–1896.

228 Jones S.K., Lizzio V., Merkel O.M. Folate receptor targeted delivery of siRNA and paclitaxel to ovarian cancer cells via folate conjugated triblock copolymer to overcome TLR4 driven chemotherapy resistance // *Biomacromolecules.* – 2016. – Vol. 17. – P. 76–87.

229 Sahay G., Querbes W., Alabi C., Eltoukhy A., Sarkar S., Zurenko C., Karagiannis E., Love K., Chen D., Zoncu R., Buganim Y., Schroeder A., Langer R., Anderson D.G. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 653–658.

230 Gonçalves C., Mennesson E., Fuchs R., Gorvel J.-P., Midoux P., Pichon C. Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells // *Mol.*

Ther. – 2004. – Vol. 10. – P. 373–385.

231 Carregal-Romero S., Ochs M., Rivera-Gil P., Ganas C., Pavlov A.M., Sukhorukov G. B., Parak W. JNIR-light triggered delivery of macromolecules into the cytosol // J. Control. Release. – 2012. – Vol. 159. – P. 120–127.

232 Krpetic Z., Nativo P., Sée V., Prior I.A., Brust M., Volk M. Inflicting controlled nonthermal damage to subcellular structures by laser-activated gold nanoparticles // Nano Lett. – 2010. – Vol. 10. – P. 4549–4554.

233 Symens N., Soenen S.J., Rejman J., Braeckmans K., De Smedt S.C., Remaut K. Intracellular partitioning of cell organelles and extraneous nanoparticles during mitosis // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2012. – Vol. 64. – P. 78–94.

234 Kirchenbuechler I., Kirchenbuechler D., Elbaum M. Correlation between cationic lipid-based transfection and cell division // Exp. Cell Res. – 2016. – Vol. 345. – P. 1–5.

235 Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Khrantsov Y.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. Live imaging of transgene expression in Cloudman S91 melanoma cells after polyplex-mediated gene delivery // J. Control. Release. – 2015. – Vol. 215. – P. 73–81.

236 Remaut K., Symens N., Lucas B., Demeester J., De Smedt S.C. Cell division responsive peptides for optimized plasmid DNA delivery: the mitotic window of opportunity? // J. Control. Release. – 2014. – Vol. 179. – P. 1–9.

237 Brunner S., Fürtbauer E., Sauer T., Kursa M., Wagner E. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation // Mol. Ther. – 2002. – Vol. 5. – P. 80–86.

238 Grosse S., Thévenot G., Monsigny M., Fajac I. Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? // J. Gene Med. – 2006. – Vol. 8. – P. 845–851.

239 Matz R.L., Erickson B., Vaidyanathan S., Kukowska-Latallo J.F., Baker J.R., Orr B.G., Banaszak Holl M.M. Polyplex exposure inhibits cell cycle, increases inflammatory response, and can cause protein expression without cell division // Mol. Pharm. – 2013. – Vol. 10. – P. 1306–1317.

240 Grandinetti G., Reineke T.M. Exploring the mechanism of plasmid DNA nuclear

- internalization with polymer-based vehicles // *Mol. Pharm.* – 2012. – Vol. 9. – P. 2256–2267.
- 241 Grandinetti G., Reineke T.M. Exploring the mechanism of plasmid DNA nuclear internalization with polymer-based vehicles // *Mol. Pharm.* – 2012. – Vol. 9. – P. 2256–2267.
- 242 Grabar C.R., Freeman G., Hommer M.B., Natan M.J. Preparation and characterization of Au colloid monolayers // *Anal Chem.* – 1995. – Vol. 67. – P. 735–743.
- 243 Yuan H., Khoury C.G., Hwang H., Wilson C.M., Grant G.A., Vo-Dinh T. Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging // *Nanotechnology.* – 2012. – Vol. 23. – Art. No. 07510.
- 244 Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Khlebtsov N.G. Improved size-tunable synthesis and SERS properties of Au nanostars // *J. Nanopart. Res.* – 2014. – Vol. 16. – Art. No. 2623.
- 245 Zhang L., Sha X., Fan Q.-K., Han L., Yin Y.-D., Gao C.-B. Gold nanoshurikens with uniform sharp tips for chemical sensing by the localized surface plasmon resonance // *Nanoscale.* – 2017. – Vol. 9. – P. 17037–17043.
- 246 Nikoobakht B., El-Sayed M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method // *Chem. Mater.* – 2003. – Vol. 15 (34). – P. 1957–1962.
- 247 Khlebtsov B., Khanadeev V., Pylaev T., Khlebtsov N.A. New T-Matrix solvable model for nanorods: TEM-based ensemble simulations supported by experiments // *J. Phys. Chem. C.* – 2011. – Vol. 115. – P. 6317–6323.
- 248 Ye1 X., Zheng Ch., Chen J., Gao Y., Murray C.B. Using Binary surfactant mixtures to simultaneously improve dimensional tunability and monodispersity in the seeded-growth of gold nanorods // *Nano Lett.* – 2013. – Vol. 13. – P. 765–771.
- 249 Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Ye J., Sukhorukov G.B., Khlebtsov N.G. Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture // *Langmuir.* – 2014. – Vol. 30. – P. 1696–1703.

250 Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. // Пер. с англ. / Под ред. Д. Гловера. — М.: Мир, 1988. — 538 с.

251 URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0534?SID=srch-srp-0534#/R0534?SID=srch-srp-R0534> (дата обращения 2020-01-11).

252 Cullander C. Fluorescent probes for confocal microscopy // Confocal Microscopy Methods and Protocols / S.W. Paddock (ed.). – Methods Mol. Biol., 1999. – Vol. 122 – P. 59-73.

253 URL: http://ibidi.com/fileadmin/support/application_notes/AN33_Live_Dead_staining_with_FDA_and_PI (дата обращения 2019-10-18).

254 Niks M., Otto M., Štefanović J. Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 130. – P. 149.

255 Rampersad S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // Sensors (Basel). – 2012. – Vol. 12 (9). – P. 12347–12360.

256 Geraghty R.J., Capes-Davis A., Davis J.M., Downward J., Freshney R.I., Knezevic I., Lovell-Badge R., Masters J.R.W., Meredith J., Stacey G.N., Thraves P., Vias M. Guideline for generation of stable cell lines // Br. J. Cancer. – 2014. – Vol. 111. – P. 1021–1046.

257 Schillers H., Rianna C., Schäpe J., Luque T., Doschke H., Wälte M., Uriarte J.J., Campillo N., Michanetzis G.P.A., Bobrowska J., Dumitru A., Herruzo E.T., Bovio S., Parot P., Galluzzi M., Podestà A., Puricelli L., Scheuring S., Missirlis Y., Garcia R., Odorico M., Teulon J.-M., Lafont F., Lekka M., Rico F., Rigato A., Pellequer J.-L., Oberleithner H., Navajas D., Radmacher M. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for measuring soft and biological samples // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – Art. No 5117.

258 Efremov Y.M., Wang W.-H., Hardy S.D., Geahlen R.L., Raman A. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement

- curves // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – Art. No 1541.
- 259 Efremov Y.M., Velay-Lizancos M., Weaver C.J., Athamneh A.I., Zavattieri P.D., Suter D.M., Raman A. Anisotropy vs isotropy in living cell indentation with AFM // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. – Art. No 5757.
- 260 Garcia P.D., Garcia, R. Determination of the elastic moduli of a single cell cultured on a rigid support by force microscopy // *Biophys. J.* – 2018. – Vol. 114 (12). – P. 2923–2932.
- 261 ДЫКМАН Л.А., Хлебцов Н.Г. Методы химического синтеза коллоидного золота // *Russ Chem Rev.* – 2019. – Т. 88 (3). – С. 229–247.
- 262 Maksimova I.L., Akchurin G.G., Terentyuk G.S., Khlebtsov B.N., Akchurin G.G. Jr., Ermolaev I.A., Skaptsov A.A., Revzina E.M., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. Laser photothermolysis of biological tissues by using plasmon-resonance particles // *Quantum Electron.* – 2008. – Vol. 38. – P. 536–542.
- 263 Ray P.Ch., Yu H., Fu P.P. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs // *J. Environ. Sci. Heal.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1–35.
- 264 Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Pylaev T.E., Bibikova O.A., Staroverov S. A., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov N.G. New types of nanomaterials: powders of gold nanospheres, nanorods, nanostars, and gold–silver nanocages // *Nanotechnologies in Russia.* – 2013. – Vol. 8. – P. 209–219.
- 265 Pylaev T., Avdeeva E., Khlebtsov B., Zakharevich A., Khlebtsov N. A novel centrifuge-based approach for tunable 2D layering of plasmonic nanoparticles // *Proc. SPIE.* – 2019. – Vol. 11067. – Art. No 110671I.
- 266 Pyrzyńska K. Recent developments in the determination of gold by atomic spectrometry techniques // *Spectrochim. Acta B.* – 2005. – Vol. 60 (9-10). – P. 1316–1322.
- 267 Spanos I., Auer A.A., Neugebauer S., Deng X., Tüysüz H., Schlögl R. Standardized benchmarking of water splitting catalysts in a combined electrochemical flow cell / inductively coupled plasma–optical emission spectrometry (ICP-OES) Setup // *ACS Catal.* – 2017. – Vol. 7 (6). – P. 3768–3778.

- 268 Drescher D., Giesen C., Traub H., Panne U., Kneipp J., Jakubowski N. Quantitative imaging of gold and silver nanoparticles in single eukaryotic cells by laser ablation ICP-MS // *Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 84 (22). – P. 9684–9688.
- 269 Qin Z., Bischof J.C. Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – Vol. 41. – P. 1191–1217.
- 270 Cheng L., Yang K., Li Y., Zeng X., Shao M., Lee S.-T., Liu Z. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – P. 2215–2222.
- 271 Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Determination of the Minimum Temperature Required for Selective Photothermal Destruction of Cancer Cells with the Use of Immunotargeted Gold Nanoparticles // *Photochem. Photobiol.* – 2006. – Vol. 82. – P. 412–417.
- 272 Pissuwan D., Niidome T., Cortie M.B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems // *J. Control. Release.* – 2011. – Vol. 149. – P. 65–71.
- 273 El-Andaloussi S., Järver P., Johansson H.J., Langel Ü. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study // *Biochem. J.* – 2007. – Vol. 407. – P. 285–292.
- 274 URL: <http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-expression-and-analysis/transfection-selection/lipofectamine-3000-ru.html> (дата обращения 2019-07-23).
- 275 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // Пер. с англ. / Под ред. А.А. Баева, К.Г. Скрыбина. – М.: Мир. 1984. – 480 с.
- 276 Gu L., Koymen A.R., Mohanty S.K. Crystalline magnetic carbon nanoparticle assisted photothermal delivery into cells using CW near-infrared laser beam // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – Art. No 5106.
- 277 Gilbert R. Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins : what

- structural studies tell us // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – Vol. 59. – P. 832–844.
- 278 Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Surface Morphology of a Gold Core Controls the Formation of Hollow or Bridged Nanogaps in Plasmonic Nanomatryoshkas and Their SERS Responses // *J. Phys. Chem. C.* – 2016. – Vol. 120. – Art. No 15385.
- 279 Lukianova-Hleb E., Hu Y., Latterini L., Tarpani L., Lee S., Drezek R.A., Hafner J.H., Lapotko D.O. Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles // *ACS Nano.* – 2010. – Vol. 4. – P. 2109–2123.
- 280 Hashimoto S., Werner D., Uwada T. Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem Rev.* – 2012. – Vol. 13. – P. 28–54.
- 281 Lachaine R., Boulais É., Rioux D., Boutopoulos C., Meunier M. Computational design of durable spherical nanoparticles with optimal material, shape, and size for ultrafast plasmon-enhanced nanocavitation // *ACS Photonics.* – 2016. – Vol. 3. – P. 2158–2169.
- 282 Kalies S., Heinemann D., Schomaker M., Gentemann L., Meyer H., Ripken T. Immobilization of gold nanoparticles on cell culture surfaces for safe and enhanced gold nanoparticle-mediated laser transfection // *J. Biomed. Opt.* – 2014. – Vol. 19. – Art. No 70505.
- 283 Pi J., Yang F., Jin H., Huang X., Liu R., Yang P., Cai J. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23 (23). – P. 6296–6303.
- 284 Pastrana H.F., Cartagena-Rivera A.X., Raman A., Ávila A. Evaluation of the elastic Young's modulus and cytotoxicity variations in fibroblasts exposed to carbon-based nanomaterials // *J. Nanobiotechnol.* – 2019. – Vol. 17 (1). – Art. No 32.
- 285 Nikolaev N.I., Müller T., Williams D.J., Liu Y. Changes in the stiffness of human mesenchymal stem cells with the progress of cell death as measured by atomic force microscopy // *J. Appl. Biomech.* – 2014. – Vol. 47 (3). – P. 625–630.

286 Rotsch C., Radmacher M. Drug-Induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 78 (1). – P. 520–535.

287 Kwon S., Kim K.S. Qualitative analysis of contribution of intracellular skeletal changes to cellular elasticity // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2019. – Vol. 77. – P. 1345–1355.

288 Saklayen N., Kalies S., Madrid M., Nuzzo V., Huber M., Shen W., Sinanan-singh J., Heinemann D., Heisterkamp A., Mazur, E. Analysis of poration-induced changes in cells from laser-activated plasmonic substrates // *Biomed. Opt. Express.* – 2017. – Vol. 8 (10). – P. 4756–4771.

289 McNeil P.L., Terasaki M. Coping with the inevitable: how cells repair a torn surface membrane // *Nat. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 3 (5). – P. E124–E129.