

На правах рукописи



АВДЕЕВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

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

Специальность 03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Пылаев Тимофей Евгеньевич

Официальные оппоненты: **Корнилова Елена Сергеевна**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, лаборатория динамики внутриклеточных мембран, главный научный сотрудник

Ломова Мария Владимировна
кандидат физико-математических наук,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», факультет нано- и биомедицинских технологий, кафедра физики полупроводников, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПИМУ), г. Нижний Новгород

Защита состоится «3» июня 2021 года в 13:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1., ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Грабович Маргарита Юрьевна



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

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 [Stewart M.P. et al., *Chem. Rev.*, 2018]. Одной из наиболее перспективных и интенсивно изучаемых стратегий доставки НК являются системы на основе микро- и наночастиц (НЧ), которые инкапсулируют или адсорбируют молекулы НК [Chen G. et al., *Chem. Rev.*, 2016], что приводит к улучшению способности проникновения в клетки и повышению эффективности трансфекции. Наиболее популярным классом наноматериалов, используемых в качестве основы для создания систем внутриклеточной доставки являются наночастицы золота (НЧЗ) [Fernanda M. et al., *J. Toxicol. Environ. Health B.*, 2016]. Преимущества НЧЗ обусловлены уникальным набором физико-химических свойств [Dykman L.A., Khlebtsov N.G., *Biomaterials*, 2016], 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) [Tiefenboeck P. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2018], химические (реагенты для трансфекции [Dykman L.A., Khlebtsov N.G., *Biomaterials*, 2016]), или физические (электропорация [Juliano R. et al., *Annals of the N. Y. Academy of Sci.*, 2006], ультразвук [Schwarze S. R. et al., *Trends in Pharm. Sci.*, 2000], лазерная трансфекция или оптопорация [Juliano R.L. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015]) методы. В последнее время активно исследуется оптическая трансфекция клеток с использованием НЧЗ [Lachaine R. et al., *ACS Photonics*, 2016; Schomaker M. et al., *J. Biophotonics*, 2015]. Принцип метода состоит в фототермическом нагреве плазмонно-резонансными НЧ, локализованными вблизи клеточных мембран, что приводит к кратковременному увеличению проницаемости последних для целевых молекул [Hardee C.L. et al., *Genes*, 2017]. Несмотря на высокую производительность и простоту, эта методика основана на инкубации клеток с суспензией НЧ [Garcia-Sanchez A. et al., *Methods Mol. Biol.*, 2016]. Неспецифическая и неконтролируемая адсорбция НЧ на мембране и/или проникновение в цитозоль может негативно отразиться на жизнеспособности клеток, и эффективности трансфекции.

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 влиять на жизнеспособность клеток и стабильность доставляемых объектов; большой расход дорогостоящих векторов и пр. Поэтому, несмотря на сравнительную дешевизну непрерывных источников лазерного излучения, их применение не получило широкого распространения (редким примером является [Bisker G. et al., *J. Opt. Soc. Am. B.*, 2012]). Напротив, применение установок с импульсными источниками лазерного облучения (нано- или фемтосекундными) со сравнительно высокой интенсивностью облучения в узкофокусированном пучке; возможностью настройки индивидуальных параметров световой волны и режимов сканирования объекта, считается гораздо более перспективным и многообещающим [Kalies S. et al., *J. Biophotonics*, 2014; Schomaker M. et al., *J. Biophotonics*, 2015; Dykman L.A., Khlebtsov N.G, *Biomaterials*, 2016]. 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. **Актуальность и научно-практическая значимость** темы диссертации определяется отсутствием единой универсальной технологии внутриклеточной доставки, отвечающей всему комплексу требований.

Исходя из вышесказанного, **целью диссертационной работы** являлись разработка и оптимизация универсальной системы плазмонной оптопорации животных клеток.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи исследования**:

- Разработать технологию создания платформ для оптопорации клеток на основе ассемблированных НЧЗ на поверхности пластиковых субстратов;
- Получить модифицированные клетки HeLa со стабильной экспрессией гена флуоресцентного белка и провести сравнения эффективности доставки и жизнеспособности клеток с коммерческими химическими агентами на основе липокатионов;
- Определить оптимальные режимы облучения и параметры слоев НЧЗ для эффективной оптопорации на модели доставки непенетрирующих красителей в клетки HeLa;
- Провести апробацию разрабатываемой системы для доставки модельных непенетрирующих агентов и ДНК-плазмид в «трудно трансфицируемые» клетки эпидермоидной карциномы человека A431;
- 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 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 ассемблированных 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.

Научно-практическая значимость работы определяется тем, что в ней решен мультидисциплинарный комплекс задач, который может быть востребован 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).

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и их соответствием теоретическим расчетам, а также качественным и количественным согласием с результатами независимых исследований других авторов.

На защиту выносятся следующие основные положения и результаты:

- 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.

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: данная работа была частично поддержана грантами Российского научного фонда (17-74-10090, 18-14-00016, 14-13-01167), РФФИ 16-02-00054а; программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»;

Апробация результатов:

Основные результаты диссертации представлялись автором на следующих научных конференциях:

- Saratov Fall Meeting – International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophysics, Saratov (Саратов, 2018-2019 два стендовых доклада).
- Международная научно-практическая конференция: «Биотехнология: наука и практика», Севастополь, Россия, 2019 (устный доклад).
- VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии, организованная Советом молодых ученых и специалистов ИИЦ РАН, г. Санкт-Петербург, 2020 (заочное участие)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 4 статьи в журналах из перечня, рекомендованного ВАК, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ, и 10 тезисов докладов.

Структура и объём 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.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы работы и её научно-практическое значение, представлены объекты и методы исследования.

В **Главе 1** представлен критический анализ современных данных об известных методах внутриклеточной доставки НК, гипотетических механизмов, лежащих в основе их действия, преимуществ и ограничений на пути к внедрению в клиническую и лабораторную практику; индивидуальных параметрах клеток-мишеней, доставляемых функциональных НК. Особое внимание уделено рассмотрению оригинальных систем доставки на основе плазмонно-резонансных наночастиц, том числе в комбинации с лазерным облучением.

Сведения об использованных **материалах и методах** изложены в **Главе 2**. В ней перечислены реактивы, оборудование, буферные растворы; а также используемые агенты для доставки, клетки млекопитающих и бактерий, источники лазерного облучения.

Непенетрирующие флуоресцентные *молекулярные агенты*: пропидий иодид (ПИ, Sigma #P4170, мол. масса 670 Да, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=493/636$ нм) и набор флуоресцирующих производных декстранов различной мол. массы (ФИТЦ-декстраны (Invitrogen): #BCBV4765, 3-5 кДа, #SLBN7802V, 10 кДа, #SLBN7796V, 40 кДа; ТРИТЦ-декстран Sigma #42874, 40 кДа).

Плазмидные векторы: с внутриклеточной продукцией зеленого *phMGFP* (Promega #TB320, GFP, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=488/520$ нм) и красного флуоресцентных белков *pRabCherry* (Addgene #27679, mCherry, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=530/650$ нм), и экстраклеточной продукцией хемилюминесцирующей люциферазы *pCMV-GLuc-2* (BioLabs #N8081, GLuc, $\lambda_{em}=475$ нм), далее по тексту обозначенные как *nGFP*, *nRFP* и *nGLuc*, соответственно. Нарботку высокоочищенных препаратов плазмидной ДНК осуществляли методом молекулярного клонирования в клетках рекомбинантного штамма кишечной палочки *Escherichia coli* XL1-Blue с последующей препаративной экстракцией коммерческим набором GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo #K0481).

Клеточные линии: постоянные клеточные линии карциномы шейки матки человека HeLa, клетки эпидермальной карциномы человека A431, фибробластоподобные клетки почки африканской зеленой марышки Vero, эпителиальные клетки яичника китайского хомячка СНО и клетки эмбриональной почки человека НЕК 293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Источники лазерного облучения. Коммерческая установка LSF-20H (Мора, HG-Tech, Китай) с перенастраиваемым импульсным наносекундным 1064-нм иттербиевым лазером номинальной мощностью 20 Вт, узкосфокусированным пучком (диаметр пятна в перетяжке 3 мкм) и автоматизированной подвижкой по осям X-Y-Z. В качестве непрерывного источника использовали установку с длиной волны лазера 808 нм (Optronics, Россия), номинальной мощностью 4 Вт и расфокусированным пучком по всей облучаемой поверхности.

Перечень используемых методов. *Аналитические:* UV-vis спектроскопия, спектрофлуориметрия, метод динамического рассеяния света (ДРС), проточная цитофлуориметрия. *Микроскопия:* световая (фазово-контрастная, флуоресцентная и лазерная конфокальная микроскопия), электронная просвечивающая (ПЭМ) и сканирующая (СЭМ); зондовая (атомно-силовая, АСМ). *Цитологические:* культивирование и криоконсервация клеток млекопитающих и бактерий; определение жизнеспособности (колориметрическое определение дыхательной активности) животных клеток и антибиотикорезистентности бактерий; стабильная трансфекция и селективный отбор клонов. *Молекулярно-биологические:* экстракция геномной и плазмидной ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), агарозный гель-электрофорез, получение рекомбинантных ДНК-плазмид методом молекулярного клонирования.

В заключительной части главы 2 представлены оригинальные методические подходы и разработки в области современных *нанобио- и лазерных технологий*, определяющие научно-практическую значимость и новизну работы: модифицированные протоколы синтеза, функционализации поверхности и характеристики образцов НЧЗ с различными физико-химическими параметрами; получение и характеристика 2-D слоев НЧЗ на пластиковых и стеклянных поверхностях; лазерного облучения клеток на платформах слоев НЧЗ (плазмонно-индуцированной оптопорации).

Глава 3 содержит описание разработанной технологии получения и детальные физико-химические характеристики коллоидов и слоев НЧЗ, а также результаты тестирования биосовместимости полученных слоев НЧЗ на модельных клеточных линиях.

3.1 Характеристика наночастиц

Для оценки влияния геометрических свойств НЧ на эффективность оптопорации клеток на слоях НЧЗ и проверки гипотезы о плазмонно-индуцированном механизме, лежащем в основе её работы, были синтезированы образцы ЗНЗ и наностержней (НСст) с длинами волн ПР в области 800 и 1000 нм. В качестве отрицательного контроля использовали золотые наносферы (НСф) с ПР в области 520 нм, вне диапазона длин волн используемых в работе источников лазерного облучения. Препараты НЧЗ были синтезированы методами жидкофазной химии по стандартным протоколам с нашими незначительными модификациями. Спектры экстинкции НЧЗ (рис. 1 а), были получены с использованием UV-vis спектрофотометров (Analytik Jena, Германия): Specord BS-250, S300Vis, S600UV-vis. ПЭМ-микрофотографии (рис. 1 б-е) были получены на микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Германия); средние гидродинамические размеры частиц и величины их дзета потенциалов были зарегистрированы с использованием анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Свежеприготовленные препараты НСст имели положительный дзета-потенциал за счет наличия мицеллярного слоя катионного поверхностно-активного вещества ЦТАБ.

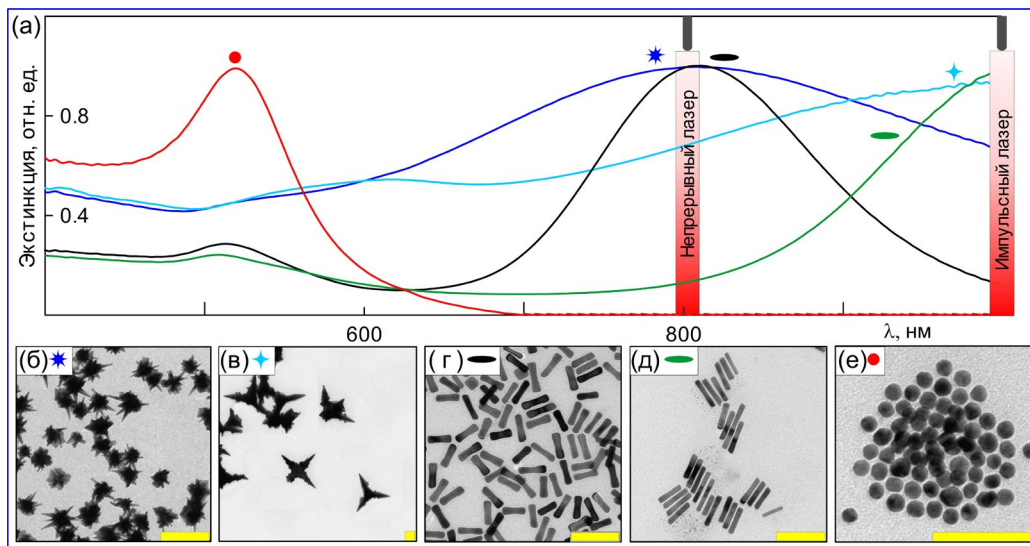


Рис. 1. Спектры экстинкции (а) и типичные ПЭМ-изображения (б-е) свежеприготовленных коллоидов, используемые в работе. Масштабные метки равны 100 нм.

Поскольку для получения 2-D слоев необходимым условием является наличие отрицательного поверхностного заряда (см. ниже, п. 3.2), препараты НСт были дополнительно модифицированы молекулами биосовместимого полимерного лиганда тиолированного полиэтиленгликоля (ПЭГ-тиола). Величины длин волн ПР, характерные средние ТЕМ- и ДРС размеры, значения дзета-потенциалов всех типов НЧЗ приведены в табл. 1.

Табл. 1. 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

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

** средний гидродинамический диаметр по данным ДРС

3.2 Получение слоев НЧЗ

Для получения монослоев ассемблированных НЧ на пластиковых (или стеклянных) субстратах была разработана простая универсальная методика [Pylaev T.E. et al., Proc. SPIE, 2018]. Технология основана на центрифугировании (ЦФ) и необратимом осаждении коллоида НЧЗ на химически активированные поливинилпиридином (ПВП) поверхности (рис. 2). Субстратами для получения слоев НЧЗ (ЗНЗ-800, ЗНЗ-1000, НСт-800, НСт-1000 и НСф-520) служили рабочие поверхности культуральных планшетов (6-, 12-, 24-, 96- луночных) или чашек Петри диаметром 35 мм.

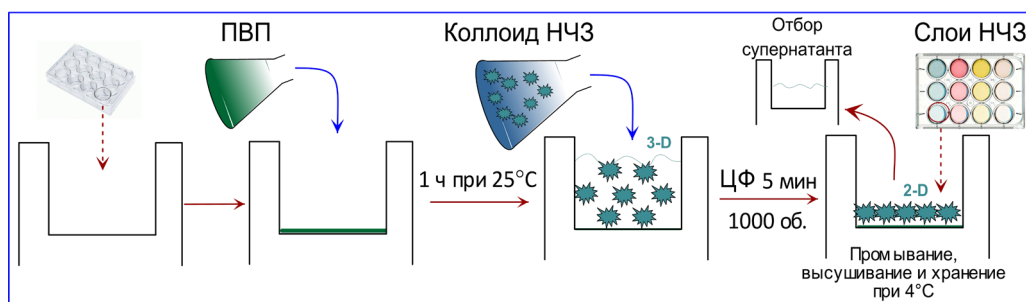


Рис. 2. Схематическое изображение способа получения слоев НЧЗ на примере лунки культурального планшета

Оптимальные режимы ЦФ были определены для всех типов НЧЗ (см. ниже, табл. 2) таким образом, чтобы результирующие слои содержали частицы (с соответствующими исходным коллоидам спектральными характеристиками), с максимально возможной величиной адсорбции и равномерностью получаемого покрытия (рис. 3 з).

В качестве альтернативного варианта получения слоев ЗНЗ-800 может быть использовано самоасSEMBЛИРОВАНИЕ частиц. Инкубация планшетов с добавленными коллоидами в течение 24 ч при 4 °С, приводила к получению неравномерных слоев (рис. 3 ж) вследствие неконтролируемой агрегации частиц. Осаждение НСт и НСф путем самоседиментации невозможно в принципе вследствие относительно малого размера частиц по сравнению с ЗНЗ.

Финальная стадия получения слоев НЧЗ состояла в промывке дистиллированной водой (3-5 раз), высушивании на воздухе и стерилизации инкубацией в 96% этаноле в течение 30 мин с последующим УФ-облучением в течение 15 мин. Готовые планшеты со слоями НЧЗ могли храниться при 4 °С продолжительное время до использования в экспериментах.

3.3 Характеристика слоев НЧЗ

Спектры экстинкции в спектральном диапазоне 370-1100 нм были измерены для всех полученных слоев НЧЗ, дополнительно было проведено спектрофотометрическое 2-D сканирование поверхности. Примеры изображений слоев НЧЗ, полученных с использованием сканирующего электронного (MiraTescan, Tescan, США) и зондового (BioScope Resolve, Bruker, США, совмещенного с Axio Observer, Carl Zeiss, Германия) микроскопов, приведены на рис. 3 в, г и 5 в.

3.3.1 Равномерность покрытия

Равномерность слоев НЧЗ является принципиально важным параметром при их использовании для оптопорации клеток. Контроль равномерности нанесения НЧЗ в слоях производился путем регистрации оптической плотности на планшетном UV-vis ридере Spark 10M (Tescan, Австрия) на фиксированной длине волны, соответствующей положению ПР исходных коллоидов, в режиме 2-D сканирования по всей площади слоев НЧЗ. Длины волн максимумов ПР исходных коллоидов и слоев практически совпадали при оптимальных режимах ЦФ, что свидетельствовало о сохранении плазмонных свойств индивидуальных частиц при асSEMBЛИРОВАНИИ. Представленные на рис. 3 а-д цветографические диаграммы отображают степень 2-D равномерности упаковки НЧЗ в терминах градиента синего цвета. Все полученные слои НЧЗ подвергались данному скринингу, позволяющему оперативно (не более 5 мин на измерение и обработку данных) оценить пригодность слоев для дальнейшего использования.

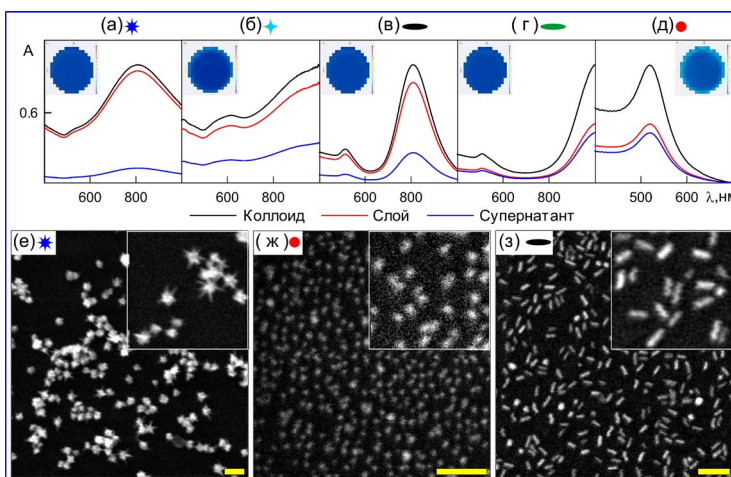


Рис. 3. Нормированные спектры экстинкции исходных коллоидов, супернатантов после ЦФ, полученных слоев и спектрограммы степени равномерности 2-D слоев (на вставках) ЗНЗ-800 (а), ЗНЗ-1000 (б), НСт-800 (в), НСт-1000 (г), НСф-520 (д). Обзорные и увеличенные (на вставках) СЭМ-микрофотографии слоев ЗНЗ-800 (е), НСф-520 (ж), НСт-800 (з), полученных ЦФ. Масштабные полосы соответствуют 100 нм.

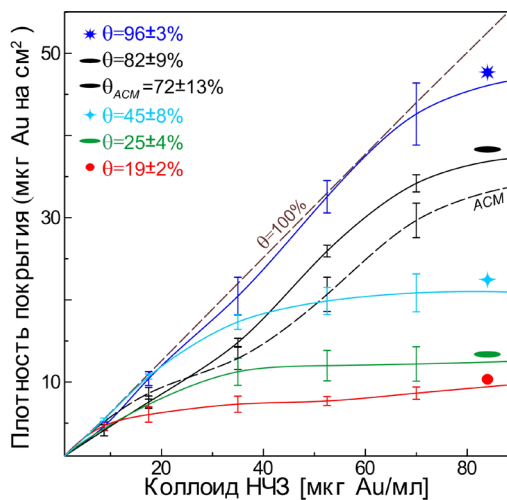


Рис. 4. Изотермы адсорбции слоев НЧЗ, рассчитанные по данным UV-vis спектрофотометрии (сплошные линии) и АСМ-микроскопии (черная пунктирная линия), теоретическая кривая для слоя с $\theta = 100\%$ обозначена коричневым пунктиром.

Табл. 2. Оптимальные режимы ЦФ, средние значения величин адсорбции (θ), экспериментальные и расчетные данные удельного количества частиц и 2-D плотностей покрытия слоев НЧЗ всех типов. Пояснения в тексте. Разброс значений представлен в виде стандартных отклонений ($n=100$).

Тип НЧ	Режимы ЦФ*		Эксперимент			Расчет для слоя при $\theta = 100\%$		Расчет для монослоя	
	g	Время, мин	θ , %	$C_{\text{слой}}^{**}$	N_S^{***}	$C_{\text{слой}}$	N_S	$C_{\text{слой}}$	N_S
ЗНЗ-800	1000	5	96±3	37±3.6	3.3±0.3	44	3.5±0.4	327±0.4	26±1.9
ЗНЗ-1000	1000	5	45±8	20±3.5	7.3±0.8	44	16±1.9	44±2.1	16±2.1
НСт-800	2000	20	82±9	37±2	1200±156	44	146±13	114.5±12	3800±494
НСт-1000	1000	10	25±4	11±1.6	750±83	44	3000±278	18.3±1.4	1250±130
НСф-520	2000	30	19±2	11±2	33±2.4	44	168±15	1666±159	5000±493

Примечания: *Центрифуга Eppendorf 5810R, оснащенная бакет-ротором S-4-104 для ЦФ планшетов
 ** $C_{\text{слой}}$ – содержание Au, мкг/см² (расчет по UV-vis данным)
 *** N_S – число частиц на единицу площади, $\times 10^8$ шт./см²

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 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, или в пересчете на число частиц $7.9 \pm 0.8 \times 10^{10}$, $1.6 \pm 1.4 \times 10^{11}$ и $3.5 \pm 3.2 \times 10^{11}$ шт/см². 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 $40 \pm 3.7 \times 10^{10}$ шт/см², соответственно. Следует отметить, что 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.

3.3.2 Величина адсорбции

Величина адсорбции частиц (θ) для каждого типа НЧЗ была определена путем вычитания нормированных значений оптической плотности на длине волны максимума ПР образцов исходных коллоидов и супернатантов после ЦФ. На рисунке 4 представлены изотермы адсорбции полученных слоев НЧЗ. Наиболее приближенной к абсолютной ($\theta = 100\%$) была величина адсорбции ЗНЗ-800 ($\theta = 96\%$), при этом для остальных типов НЧЗ она была существенно ниже, около 19-82% (рис. 4, табл. 2). 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). Увеличение скорости или длительности ЦФ приводит к нежелательной агрегации частиц при осаждении.

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 стандартных респираторных тестов (МТТ- и резаурин- тестов, рис. 5 е). Визуальная оценка состояния монослоя проводилась качественно прямой микроскопией (рис. 5 г) и стандартным окрашиванием на живые/мертвые клетки смесью флуоресцентных красителей ПИ/флуоресцеиндиацетата (ФДА) (рис. 5 д). Аналогичным образом была оценена биосовместимость слоев НЧЗ для других клеточных линий: Vero, CHO, A431, НЕК293. 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. Отдельно был оценен эффект лазерного облучения на слои ЗНЗ-800 и НСт-800 методами UV-vis спектроскопии (рис. 5 а, б) и АСМ-микроскопии (рис. 5 в).

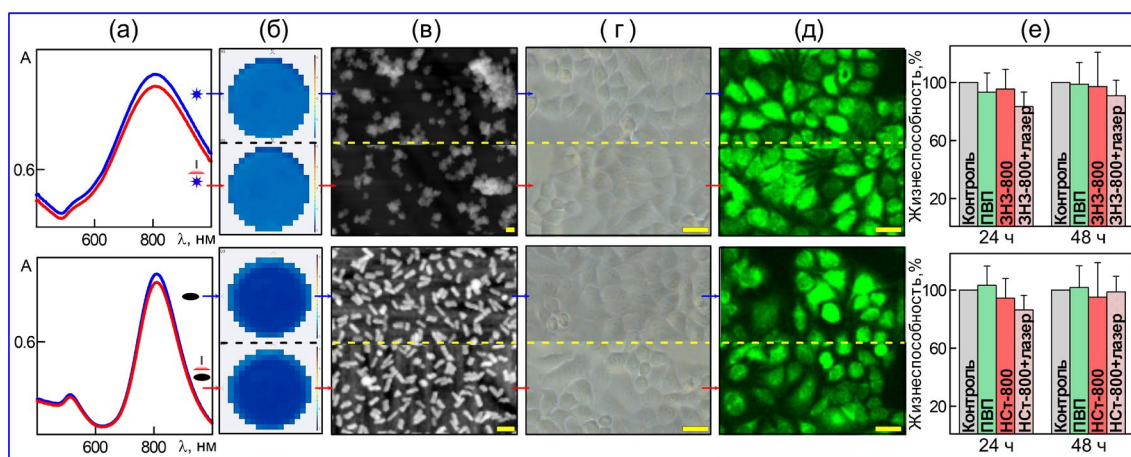


Рис. 5. Оценка эффектов облучения непрерывным лазером на характеристики слоев ЗНЗ-800 и НСт-800 и жизнеспособность клеток HeLa. Спектры экстинкции слоев (а) и изображения (б-д), полученные до (ряды 1, 3) и после облучения (ряды 2, 4): спектрограммы 2-D равномерности (б) и АСМ-изображения (в) слоев; фазово-контрастные (г) и флуоресцентные (д) микрофотографии клеток после окраски ПИ/ФДА; дыхательная активность клеток по данным резаурин-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).

Таким образом, проведенные тесты свидетельствуют об отсутствии значимых эффектов облучения и полной биосовместимости полученных слоев НЧЗ для культивирования клеток, и возможности их многократного использования в качестве платформ для оптопорации.

Глава 4 посвящена детальной оптимизации процедуры оптопорации: параметров слоев НЧЗ и режимов облучения непрерывным и импульсным лазерами. 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. 6, включает следующие стадии: культивирование 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 на всех стадиях эксперимента. Оптимизация процедуры оптопорации проводилась на клеточной линии HeLa. Оптимизируемые параметры непрерывного 800-нм лазера: длительность, удельная мощность и энергия облучения, площадь единичной облучаемой поверхности. Для импульсного 1064-нм лазера: удельная мощность, энергия, длительность и скважность импульса, площадь единичной облучаемой поверхности, скорость 2-D сканирования.

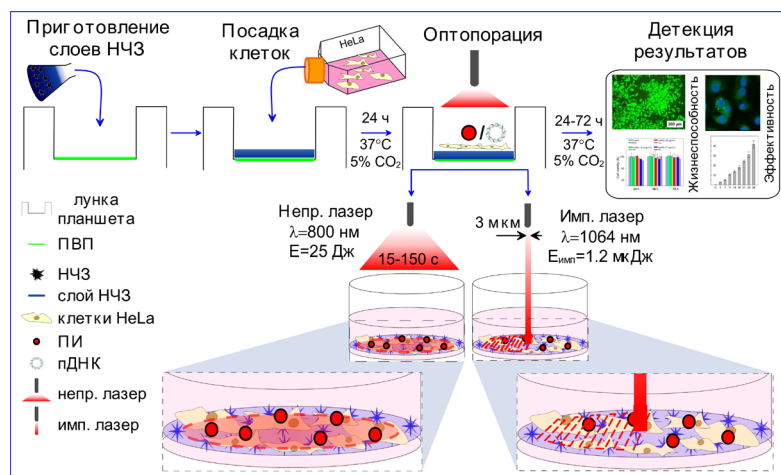


Рис. 6. Схематическое изображение типичного эксперимента по оптопорации клеток на слоях НЧЗ с применением двух источников лазерного облучения.

В качестве модельного агента для регистрации эффективности оптопорации был использован ПИ. Эффективность доставки оценивалась спустя 30 мин после облучения, путем подсчета относительного количества флуоресцирующих оптопорированных (ПИ-позитивных) клеток, нормализованного на контроль (клетки без воздействия). Жизнеспособность клеток оценивалась спустя 24 ч после оптопорации (количественно с использованием МТТ- и резаурин-тестов, качественно путем визуальной оценки состояния монослоя).

4.2 Оптимизация режимов облучения непрерывным лазером на слоях НЧЗ заключалась в определении рабочих диапазонов лазера (интенсивности, и соответственно, длительности облучения) при постоянном мониторинге общей температуры клеточной среды 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). Нижний температурный порог 38 ± 1 °C (рис. 7 а) был определен по отсутствию статистически значимого увеличения ПИ⁺ клеток после облучения контроля в течение 600 с, при этом жизнеспособность клеток была удовлетворительна. Верхний температурный порог (53 ± 2 °C) был определен для клеток, выращенных на слоях ЗНЗ-800, исходя из существенного снижения жизнеспособности клеток (рис. 7 б), и флуоресцентной микроскопии (рис. 7 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) [El-Andaloussi S. et al., *Biochem. J.*, 2007]. В таблице 3 суммированы оптимальные параметры слоев НЧЗ и режимы облучения непрерывным лазером. 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 ($90 \pm 7\%$) и жизнеспособности клеток ($86 \pm 12\%$). 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 HeLa на слоях НСт-800 с содержанием Au $10-33$ мкг/см² ($88 \pm 10\%$) и на слоях ЗНЗ-800, были сопоставимы, однако жизнеспособность клеток была значительно ниже ($68 \pm 12\%$), при этом диапазон длительности облучения варьировал от 20 до 100 с. Для достижения удовлетворительной эффективности ($79 \pm 19\%$) оптопорации клеток, выращенных на слоях НСт-1000, имеющих меньшее поглощение на длине волны непрерывного 808-нм лазера (см. рис. 1 а), требовалось значительное увеличение длительности облучения (до 200 с), жизнеспособность при этом составляла $70 \pm 18\%$.

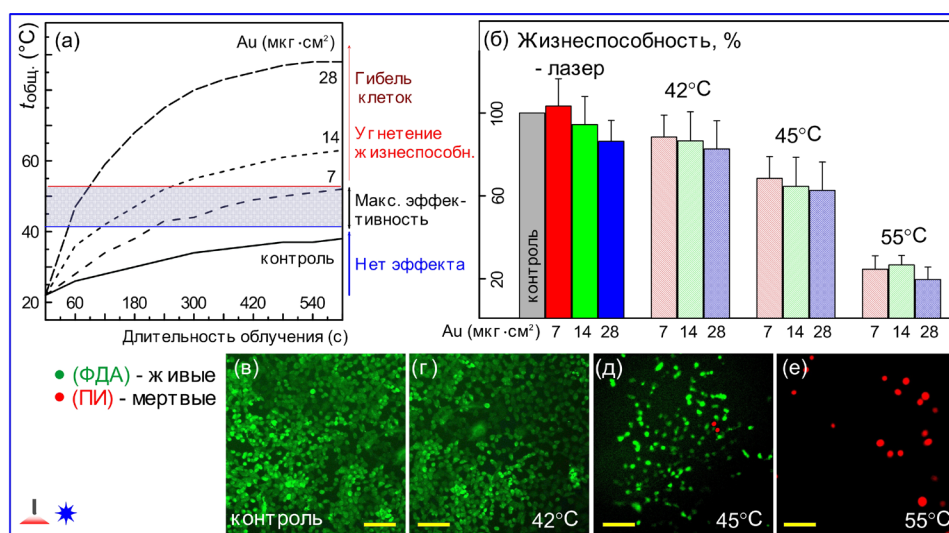


Рис. 7. Оптимизация режимов оптопорации клеток HeLa непрерывным лазером. Температурно-временной профиль для слоев ЗНЗ-800 с различными 2-D плотностями (а); жизнеспособность клеток, облученных до конечной температуры в лунках 42, 45 и 55 °С, спустя 24 ч после оптопорации: дыхательная активность, МТТ-тест (б), флуоресцентные микрофотографии после окраски ПИ/ФДА (в-е). Масштабные полосы соответствуют 200 мкм

Наконец, непоглощающие на длине волны 808 нм слои 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 проводилась 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 данные резазурин-теста), через 30 мин и 24 ч после облучения соответственно.

Табл. 3. Диапазоны значений оптимальных параметров слоев НЧЗ и соответствующих им режимов облучения при оптопорации клеток HeLa непрерывным и импульсным лазерами

Тип лазера	Параметры слоев и режимы облучения	ЗНЗ-800	ЗНЗ-1000	НСТ-800	НСТ-1000	НСф-520
Непрерывный	Е (Дж)	25				
	содержание Au (мкг/см ²)	14-27	18	10-33	12	11
	длительность облучения (с)	40-50	300	20-100	200	300
	температура клеточной среды (°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
Импульсный	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 резазурин-теста и визуальной оценки состояния монослоя клеток.

Верхний порог интенсивности облучения ($\sim 3 \pm 0.5$ мкДж), оказывающий существенное влияние на жизнеспособность клеток (10 ± 0.8 %). Нижний порог (1.2 ± 0.2 мкДж) был определен по отсутствию статистически значимого увеличения ПИ⁺ клеток после облучения (13 ± 1.2 %), при сохранении жизнеспособности на высоком уровне (95 ± 4 %). 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 (табл. 3). Далее, аналогичным образом были оптимизированы скорость сканирования, длительность и скважность импульса для слоев НЧЗ с фиксированным содержанием Au, найденные значения суммированы в табл. 3.

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, эффективность 86±11% и 89±9% оптопорации, при жизнеспособности 83±16% и 70±18%, соответственно. Следует отметить, что непоглощающие на длине волны импульсного 1064-нм лазера слои НСф-520 оказались абсолютно непригодными для оптопорации, что подтверждает известную гипотезу о связи эффективности плазмонной оптопорации с близостью длин волн лазерного облучения (непрерывного и импульсного) и положения ПР слоев НЧЗ.

Глава 5 посвящена апробации разрабатываемой системы для доставки модельных непенетрирующих агентов и ДНК-плазмид в клетки HeLa и A431; получения модифицированных клеток со стабильной продукцией флуоресцентных белков; сравнения эффективности доставки и жизнеспособности клеток с коммерческими химическими агентами на основе липокатионов. Все эксперименты были выполнены на слоях ЗНЗ-800 и облучением непрерывным либо импульсным лазером при оптимальных режимах (табл. 3)

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. 8 ж представлена зависимость относительного количества оптопорированных клеток от содержания Au. Примеры флуоресцентных микрофотографий (рис. 8 з-к) дополняют данные количественного учета. Фазово-контрастные изображения демонстрируют морфологические изменения облученных клеток (рис. 8 а, д) по сравнению с интактными (рис. 8 в) 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 резазурина-теста) активности и общее состояние монослоя клеток (по данным прижизненного окрашивания ФДА, рис. 4.2 в-е), выявлено не было.

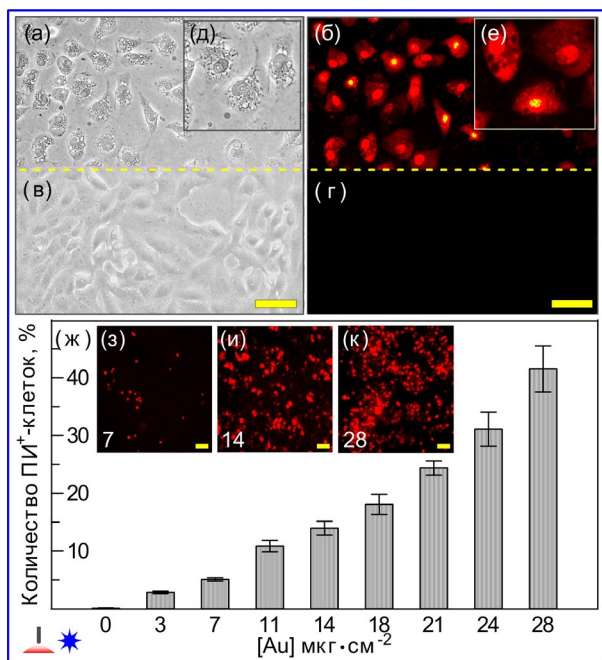


Рис. 8. Эффективность оптопорации (ж, количество ПИ⁺ клеток) клеток, выращенных на слоях ЗНЗ с различным содержанием Au. Флуоресцентные и фазово-контрастные изображения контрольных (в, г) и опытных (а, б, д, е, з-к) образцов. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм (а-г) и 200 мкм (з-к).

Набор ФИТЦ-декстранов различной молекулярной массы был также использован в качестве непенетрирующих модельных объектов для доставки в клетки HeLa. Флуоресцентный сигнал был обнаружен только в образцах оптопорированных клеток на слоях ЗНЗ-800. Количественный учет серии микрофотографий показал высокую эффективность проникновения молекул ФИТЦ-декстранов ($95 \pm 5\%$), сопоставимую с эффективностью доставки ПИ. В образцах без лазерного 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.

5.1.2 Оптопорация импульсным лазером на лазерной установке с источником, имеющим узкосфокусированный пучок, в режиме 2-D сканирования, позволила нам очень точно настраивать эффективность оптопорации, комбинируя оптимальные режимы облучения, и параметры слоев НЧЗ. На рисунке 9 б продемонстрированы наглядные результаты оптопорации сфокусированным импульсным лазером с разрешением вплоть до единичных клеток. Эффективность оптопорации (количество ПИ-позитивных клеток) внутри облученной области составляла не менее 80-95%. Так же на представленных микрофотографиях отчетливо видна граница облученной и необлученной областей монослоя 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 ($93 \pm 5\%$ по данным резаурин-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 Оптотрансфекция непрерывным лазером

Количественная оценка эффективности оптопорации и доставки плазмидных ДНК (рис. 10) 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*). Представленные на рис. 10 микрофотографии трансфицированных оптопорацией и турбофектом (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. 10 в) показало, что эффективность оптотрансфекции значительно выше, чем при использовании ТФ для доставки *pCMV-GLuc-2* ($295 \pm 9,8$ RLU и $220 \pm 11,3$ RLU, соответственно).

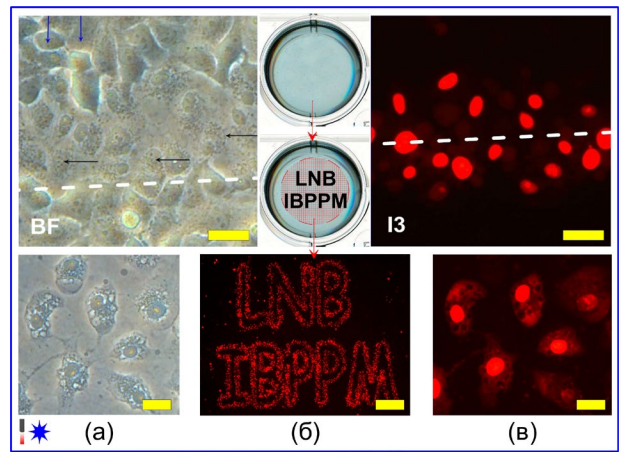


Рис. 9. Оптопорация клеток HeLa импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800. Фазово-контрастные (а) и флуоресцентные (б, в) микрофотографии клеток (оптопорированные – черные стрелки, белая пунктирная линия; интактные – синие стрелки, пространства выше-ниже белой пунктирной линии). Сверху-вниз (б): лунка 24 луночного 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).

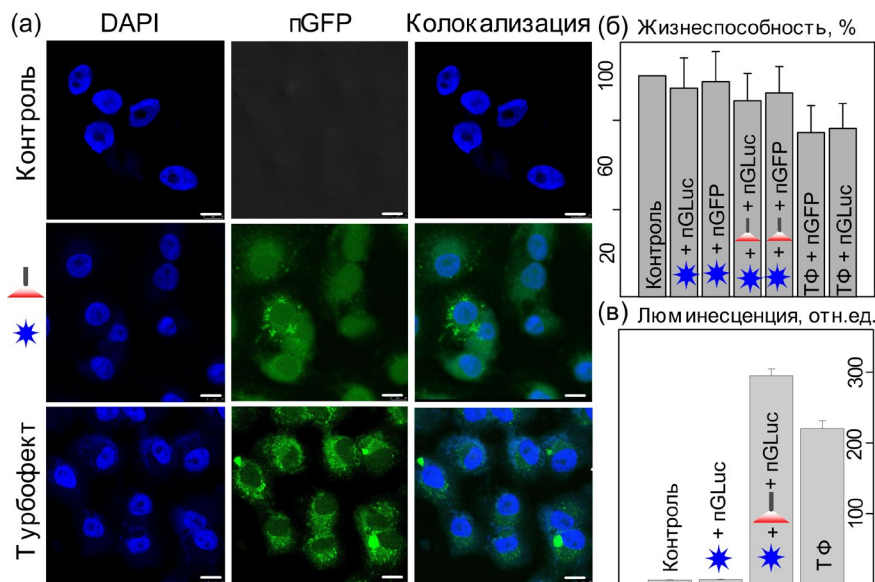


Рис. 10. Временная трансфекция плазмид в клетках HeLa, результаты сняты через 72 ч после оптопорации непрерывным лазером на слоях ЗНЗ-800. Микрофотографии трансфицированных *nGFP* клеток (а) оптопорацией (средний ряд), и ТФ (нижний ряд) по сравнению с контролем (верхний ряд). Ядра клеток дополнительно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

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. 11 а). Однако был выявлен существенный цитотоксический эффект препарата ТФ на клетки ($75 \pm 5\%$ по данным резаурин-теста спустя

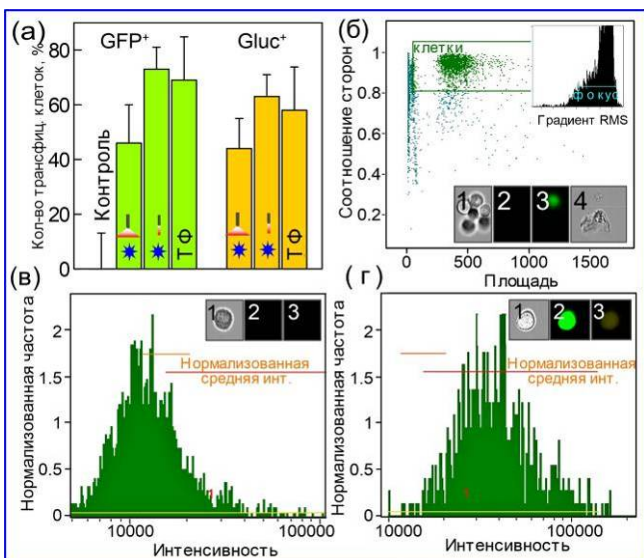


Рис. 11. Относительное количество флуоресцирующих клеток HeLa (а), спустя 72 ч после оптопорации непрерывным либо импульсным лазерами, трансфицированных ТФ и контрольных. Алгоритм пост-обработки цитофлуориметрических данных (б-г). Примеры микрофотографий дебриса (б 4) и агрегатов клеток (б), контрольных (в) и опытных (г) образцов, снятые на трех каналах цитометра (1, 2, 3).

72 ч после трансфекции), тогда как оптопорация практически не влияла на жизнеспособность клеток ($90 \pm 4\%$) (рис 10 б).

5.2.2 Оптотрансфекция импульсным лазером была проведена при оптимальных режимах облучения и параметрах слоев ЗНЗ-800 (табл. 3). Зарегистрированные проточной цитофлуориметрией значения эффективности оптотрансфекции ($72 \pm 8\%$ GFP⁺ и $63 \pm 9\%$ GLuc⁺ клеток), были сравнимы с эффективностью ТФ ($69 \pm 11\%$ GFP⁺ и $58 \pm 10\%$ GLuc⁺ клеток) (рис. 11 а), показания жизнеспособности клеток при этом составляли $90 \pm 4\%$ для оптопорации, $75 \pm 5\%$ для ТФ. Таким образом, разработанная и оптимизированная система оптопорации на слоях ЗНЗ-800 с применением импульсного лазера позволяет добиться более высоких значений эффективности и жизнеспособности, чем коммерческие трансфицирующие агенты на основе липокатионов.

5.2.3 Оптотранфекция «трудно трансфицируемых» клеток A431

Апробация системы оптопорации импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800 для доставки плазмидных ДНК в «трудно трансфицируемые» клетки была проведена на модельных клетках линии A431. Ключевыми особенностями клеток A431 является сравнительно низкая скорость пролиферации и неспособность образовывать полный монослой при культивировании, поэтому для эффективной трансфекции начальная конfluence монослоя должна быть не более 40-50%. Следует отметить, что протокол трансфекции адгезивных клеточных культур большинством доступных коммерческих систем (в том числе, липокатионными агентами) предусматривает начальную конfluence монослоя около 70%. 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 конfluence 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 липофектаминоном (ЛФ) (18±2% GFP⁺ и 19±1.8% GLuc⁺ клеток) (рис. 12 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 12 д). Качественная оценка состояния монослоя оптопорированных клеток (рис. 12 б) и трансфицированных ЛФ (рис. 12 в, большое количество открепившихся и мертвых клеток) по сравнению с контрольными (рис. 12 а) дополняет зарегистрированные количественные данные.

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

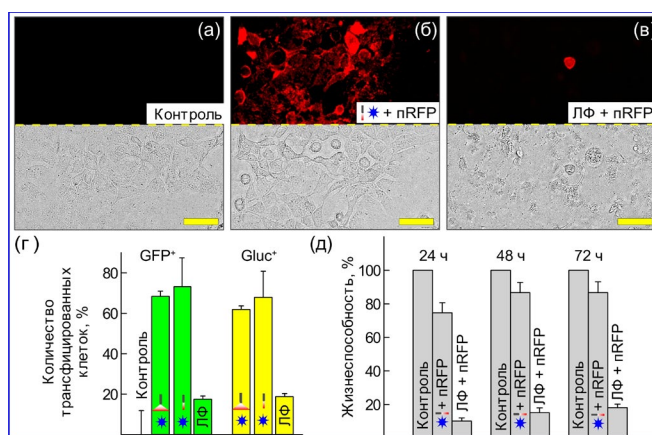


Рис. 12. Результаты оптотранфекции клеток A431 на слоях ЗНЗ-800. Флуоресцентные и фазово-контрастные микрофотографии контрольных (а), оптопорированных (б) и трансфицированных ЛФ (в) клеток. Данные проточной цитометрии: количество оптопорированных непрерывным и импульсным лазерами, трансфицированных ЛФ, относительно контрольных клеток (г). Жизнеспособность клеток (д, резазурин-тест). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

5.3 Получение клеточной линии HeLa со стабильной экспрессией гена флуоресцентного белка

Дополнительно была продемонстрирована возможность разработанной системы оптопорации 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. 13 а), идентификацией инсерции целевого фрагмента pGLuc полимеразной цепной реакцией (рис. 13 в), а также продолжительным культивированием клеток (не менее 3 месяцев после оптопорации) на селективной среде с содержанием антибиотика G418, после цикла криоконсервации/деконсервации. Микрофотографии модифицированных клеток HeLa, полученные на 21 сутки эксперимента (рис. 13 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. 13 б), была значительно лучше ($58\pm 4.3\%$), чем при оптопорации непрерывным лазером ($33\pm 3.1\%$) и трансфекции ТФ ($29\pm 3\%$). Согласно данным люциферазного теста (рис. 13 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).

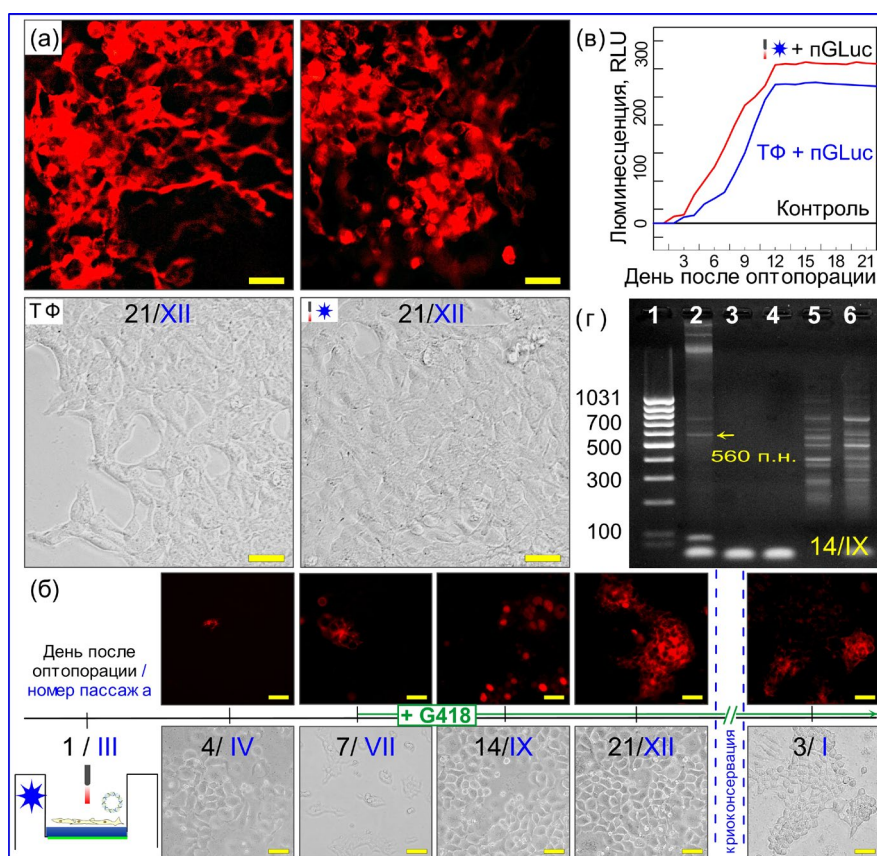


Рис. 13. Флуоресцентные и фазово-контрастные микрофотографии оптопорированных (а, правый столбец) и трансфицированных ТФ (а, левый столбец) клеток HeLa-mCherry⁺, полученные на 21 сутки после трансфекции.

Схема получения модифицированных клеток (б). Люциферазная активность клеток HeLa-GLuc⁺, трансфицированных оптопорацией, 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. 13 г). Таким образом, были продемонстрированы существенные преимущества оптотрансфекции импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800, для получения модифицированных клеток HeLa со стабильной экспрессией целевого продукта, перед липокатионными трансфицирующими агентами.

Глава 6 посвящена исследованию механизмов и рабочих гипотез, лежащих в основе разработанной системы оптопорации клеток на слоях НЧЗ, особенностей самовосстановления мембран и изучению механических свойств клеток, адсорбированных на слоях ЗНЧ, при облучении непрерывным и импульсным лазерным излучением.

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 локальным плазмонным нагревом НЧЗ, или это всего лишь эффекты, возникающие при нагреве культуральной среды, опосредованном НЧЗ. Для проверки гипотезы о роли теплового нагрева клеточной среды в качестве потенциального механизма увеличения клеточной проницаемости, планшеты с выращенными на слоях ЗНЗ клетками и добавленным раствором ПИ, были нагреты на термостатируемой водяной бане до достижения общей температуры 42 °С. Значимых отличий в количестве ПИ-позитивных клеток в опыте и контроле до и после нагревания зарегистрировано не было (данные не показаны). Следовательно, простой нагрев системы не может рассматриваться как потенциальный механизм воздействия излучения на клетки. Аналогично, отрицательными были результаты оптопорации клеток, культивируемых без слоев НЧЗ, 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

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. 14).

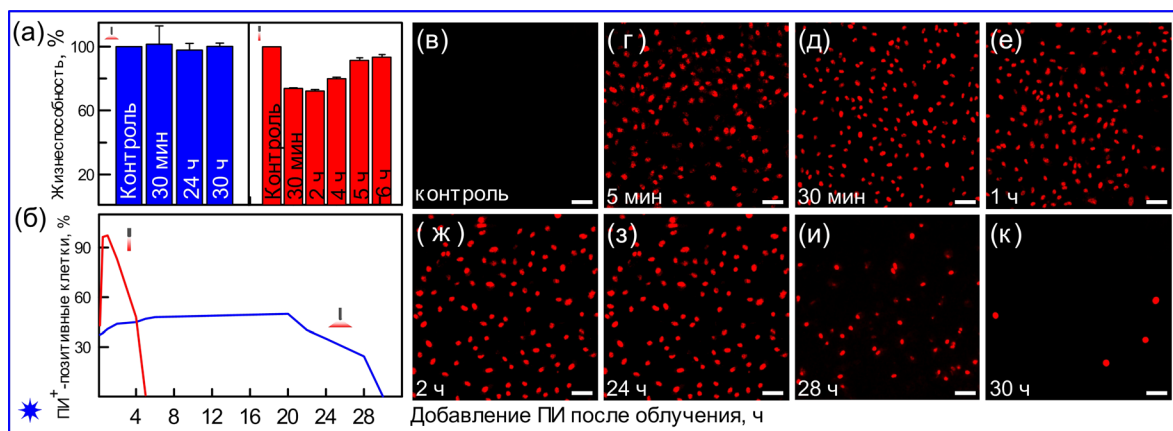


Рис. 14. Определение времени самовосстановления непроницаемости мембран клеток после облучения ИК-лазером. Жизнеспособность контрольных и опытных клеток с добавлением ПИ через различное время после облучения (а), эффективность оптопорации (б) и флуоресцентные изображения контрольных клеток (в) и опытных клеток (г – к) с добавленным ПИ в различное время после облучения. Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

Оказалось, что восстановление мембран начинается уже спустя 2 ч после оптопорации непрерывным лазером ($43 \pm 7\%$ ПИ⁺ клеток) (рис. 14 б, синяя линия), а спустя 30 ч мембраны клеток становятся полностью непроницаемыми для ПИ (рис. 14 б, синяя линия, к). Жизнеспособность клеток по данным МТТ-теста поддерживалась на высоком уровне (рис. 14 а), целостность мембраны была качественно подтверждена путем витального окрашивания монослоя клеток красителем ФДА (рис. 7 в-е).

Время, необходимое для полного восстановления непроницаемости мембран после облучения импульсным лазером, определялось по вышеописанной схеме. Уже через 30 мин начиналось восстановление целостности мембран, при этом количество ПИ-позитивных клеток составляло $95 \pm 5\%$, а спустя 5 ч после облучения мембраны стали полностью непроницаемыми для ПИ (рис. 14 б, красная линия). При этом жизнеспособность (по данным резазурин-теста) спустя 30 минут после облучения достигала $73 \pm 6\%$, а спустя 5 ч после облучения жизнеспособность оптопорированных клеток ($93 \pm 4\%$) практически соответствовала контролю (рис. 14 а).

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. Для обработки полученных данных использовали модель Герца, которая позволяет вычислить модуль Юнга (МЮ) образца на основе зависимости силы от глубины продавливания. Итоговые изображения представляют собой топографию (z , в мкм) и/или распределение (карту) модуля Юнга (Па, логарифмическая шкала). Была обнаружена значительная разница в механическом ответе клеток, облученных непрерывным и импульсным лазерами. Уменьшение МЮ, наблюдаемое в клетках, облученных импульсным лазером, 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. 14 б). 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. 15). Эти каскады могут иметь защитную роль для ядра клетки. В предыдущем исследовании [Nikolaev N.I. et al., J. Biomech., 2014] значительное увеличение жесткости клеток также наблюдалось во время прогрессирования гибели клеток и потери целостности мембран. Однако в нашем случае эти эффекты, по-видимому, в основном обратимы, поскольку не приводят к гибели клеток.

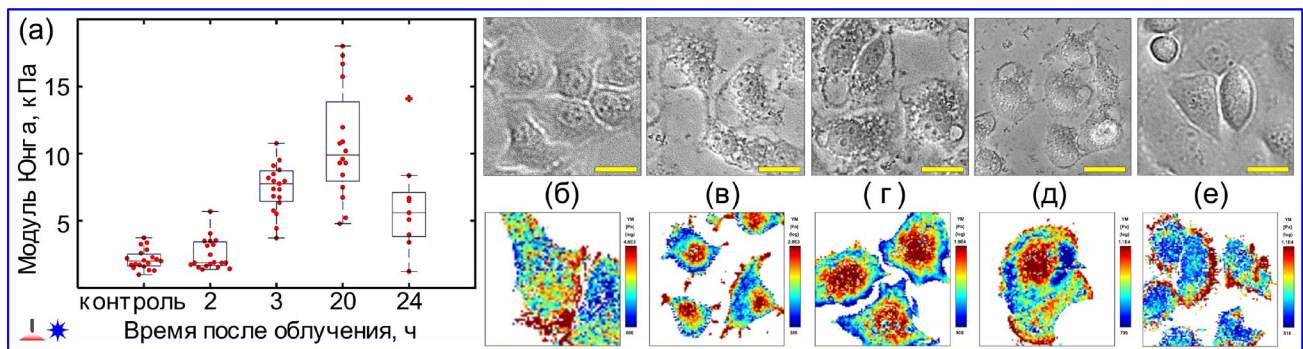


Рис. 15. Распределение МЮ (а) в популяции оптопорированных непрерывным лазером клеток HeLa, выращенных на слоях ЗНЗ-800, по сравнению с контрольными клетками. Примеры фазово-контрастных микрофотографий клеток (верхний ряд) и карты механических свойств клеток (нижний ряд), зарегистрированных для контрольных и оптопорированных клеток через 2, 3, 20 и 24 ч после облучения (б-е). Масштабные полосы соответствуют 50 мкм.

В заключении к работе отмечается, что, 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 о 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 ЗНЧ, природа субстрата) получены новые данные о возможных механизмах плазмонной оптопорации клеток на платформах слоев НЧЗ и проверены гипотезы относительно поведения отдельных компонентов системы.

2. 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.

3. 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.

4. Разработанная и оптимизированная система оптотрансфекции импульсным лазером на слоях ЗНЗ-800 имеет более высокие показатели эффективности (72±12%) и жизнеспособности клеток (92±5%) для доставки модельных плазмид в клетки HeLa по сравнению с коммерческими агентами для трансфекции (19±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).

5. 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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах:

1. Pylaev T.E., Vanzha E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers // J biophoton. 2018. Art No. e201800166. doi:10.1002/jbio.201800166.
2. Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Zakharevich A., Khlebtsov N.G. A novel centrifuge-based approach for tunable 2D layering of plasmonic nanoparticles // Proc. SPIE. 2018. Art No. 10336 (pp. 1-6). doi:10.1117/12.2522135.
3. Chumakov D.S., Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Dykman L.A., Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A. Anticancer properties of gold nanoparticles biosynthesized by reducing of chloroaurate ions with *Dunaliella salina* aqueous extract // Proc. SPIE. 2020. Art No. 1145715 (pp. 1-6). doi:10.1117/12.2564630.
4. Чумаков Д.С., Пылаев Т.Е., **Авдеева Е.С.**, Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А. Исследование цитотоксичности ультрамалых фосфониевых золотых наночастиц с использованием культур растительных и животных клеток // Российские нанотехнологии. 2019. Т. 14. С. 81–92.

Тезисы по материалам выступления на научных конференциях:

1. Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Advantageous bioanalytic & biosensorics tools based on DNA-Au nanoparticles interactions // Online workshop «EDGE-Tech: Emerging and Disruptive next-GEneration Technologies for POC», 26-30 October 2020, URL: <https://www.seeyouonlife.tv/edget-stream/>
2. Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Highly versatile and biocompatible intracellular delivery system based on the plasmonic nanoparticles layers and NIR laser exposure // 19th International Conference Laser Optics (ICLO 2020) Russia, Saint Petersburg, 2-6 November, 2020.
3. **Авдеева Е.С.**, Пылаев Т.Е., Ефремов Ю.М., Антошин А.А., Тимашев П.С., Хлебцов Н.Г. Изменение механических свойств клеток млекопитающих при оптопорации на основе монослоев золотых наночастиц с применением ИК-лазера // Материалы VII Молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Октябрь 12–15, 2020, "Гены и клетки", Т. XV, № 3, С. 40.
4. Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Nucleic acid & Au nanoparticle-based advanced functional biomaterials // The XXIV Annual Conference «Saratov Fall Meeting», VIII International Symposium on Optics and Biophotonics, Saratov, September 29 – October 2, 2020. URL: <https://sfmconference.org/sfm/20/workshops/nanobiophotonics-xvi/preliminary/619/>
5. **Avdeeva E.S.**, Pylaev T.E., Khlebtsov N.G. Au nanoparticles geometrical and optical properties as the key parameters towards the effective plasmonic layers mediated cell optoporation // The XXIII Annual Conference «Saratov Fall Meeting», XXIII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Saratov, September 23–27, 2019.
6. **Авдеева Е.С.**, Пылаев Т.Е., Хлебцов Н.Г. Новый способ высокоэффективной внутриклеточной доставки биомолекул на основе монослоев золотых наночастиц с применением ИК-лазера // VII Международная научно-практическая конференция: «Биотехнология: наука и практика», Севастополь, Сентябрь 16–20, 2019.
7. Pylaev T., Khlebtsov B., **Avdeeva E.**, Khlebtsov N. Design of a novel gene delivery system based on Au nanostar layers upon laser irradiation // International conference on nanomedicine and nanobiotechnology – 2018, Rome, Italy, September 26–28, 2018, p. 42. URL: https://www.premc.org/doc/ICONAN2018/ICONAN2018_Book_Of_Abstracts.pdf

8. Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N. A novel highly-tunable universal approach for plasmonic nanoparticles layering on 2-D surfaces // The XXII Annual Conference «Saratov Fall Meeting», XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Saratov, September 24–29, 2018. URL: <http://sfm.eventry.org/report/3234>.

9. Chumakov D., Pylaev T., **Avdeeva E.**, Dykman L., Khlebtsov N., Bogatyrev V. Study of ultra-small gold nanoparticles toxicity towards microalga *Dunaliella salina* and animal cells // The XXII Annual Conference «Saratov Fall Meeting», XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Saratov, September 24–29, 2018. URL: <http://sfm.eventry.org/report/3317>.

10. Чумаков Д.С., Пылаев Т.Е., **Авдеева Е.С.**, Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А. Характеристика размерной токсичности золотых наночастиц с использованием микропланшетной тест-системы на основе микроводоросли *Dunaliella salina* // Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Уфа, Июнь 13–17, 2018, с. 253.

Работы №1 – 4 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.

Формат 60×84 1/16. Гарнитура Times New Roman 10,
Объем 1 п. л. Тираж 100. Заказ 57.

Отпечатано в ИБФРМ РАН
Саратов, пр. Энтузиастов 13.