

УДК 535.36 + 577.336 + 541.18.535 + 577.323.2

**НОВЫЙ СПОСОБ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ
БИОМОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ МОНОСЛОЕВ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ИК-ЛАЗЕРА***Е.С. Авдеева, Т.Е. Пылаев, Н.Г. Хлебцов**Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия*

Новейшие разработки в области генно-инженерных, клеточных, тканевых и иммунобиологических технологий способствуют развитию современных биомедицинских исследований. Одной из таких технологий являются системы для внутриклеточной доставки терапевтических агентов, в первую очередь, лекарственных препаратов и генетических конструкций. Ожидается, что успешное применение подобных систем приведет к «пересмотру» традиционных представлений о способах лечения наиболее опасных заболеваний – аутоиммунных, онкологических, инфекционных и пр., и переходу медицины на качественно новый «персонализированный» уровень. Однако одной из основных проблем при переносе технологии генной терапии в клиническую практику является нехватка общедоступных способов для эффективной и безопасной целевой доставки векторов, несущих специфическую ДНК или РНК. Поэтому разрабатываемые системы должны обладать целым рядом параметров, таких как применимость с высокой эффективностью для различных типов клеток, тканей и организмов; возможность доставки объектов с варьируемыми физико-химическими параметрами; минимальное повреждающее действие (выживаемость клеток), максимальная эффективность (количество загруженных и экспрессируемых векторов), относительная дешевизна и простота исполнения [1]. Одними из традиционно используемых векторов в генной терапии являются вирусные векторы из-за их высокой эффективности трансфекции. Однако их использование в клинике ограничено проблемами безопасности, такими как иммуногенность, инсерционный мутагенез самих векторов [2]. В настоящее время активно развиваются альтернативные системы для внутриклеточной доставки генов на основе безвирусных систем, химических агентов, наноматериалов, с применением разного рода физических воздействий (механическая микроинъекция, электропорация, сонопорация, лазерное облучение [3]) и пр. Использование последнего варианта в комбинации с плазмонными наночастицами (т.н. плазмонная оптопорация клеток, или лазерная трансфекция), главным образом наночастицами золота (ЗНЧ), является крайне перспективным направлением современной биомедицины [4]. Воздействие лазерного излучения на ЗНЧ приводит к усилению электромагнитного поля и локальному высокотемпературному нагреву плазмонной частицы, что в свою очередь вызывает различные системные эффекты на живые клетки. Известно, что в зависимости от выбранных параметров лазерного излучения и ЗНЧ можно вызвать, например, осмотический шок и гибель клеток вследствие денатурации белков и генерации высокого внутриклеточного давления, либо неповреждающее воздействие на клетки образующимися вблизи мембран кавитационных пузырьков. Сочетанное неповреждающее воздействие лазерного облучения и ЗНЧ на клеточную мембрану может быть основой для создания эффективных способов внутриклеточной доставки биомолекул [5]. Основным параметром при выборе оптимального кандидата для лазерной трансфекции (или плазмонной оптопорации) клеток является полное или частичное перекрывание плазмонного пика золотых наночастиц с длиной волны лазерного излучения [3].

Проводимые нами исследования направлены на разработку и оптимизацию нового варианта плазмонной оптопорации для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот на основе кратковременного увеличения проницаемости мембран клеток, выращенных на монослоях плазмонно-резонансных наночастиц под воздействием ИК-лазерного излучения [6]. Типичная схема экспериментов состояла из нескольких этапов: иммобилизации ЗНЧ на предварительно активированных поливинилпиридином (ПВП) лунках культуральных планшетов [7]; выращивание животных клеток на слоях ЗНЧ; кратковременное однократное воздействие лазерным облучением и дальнейшее культивирование клеток для детекции результатов оптопорации и их жизнеспособности. Оптимизация процедуры включала тщательный подбор всех параметров ЗНЧ (плотность монослоя, способ иммобилизации, размер частиц и т. д.) [8], а также режимов лазера (мощность, длина волны, длительность облучения, рабочая температура и т. д.). Количественная валидация эффективности

разработанного метода оптопорации клеток проводилась с использованием традиционного арсенала инструментов, модельных объектов, и методов статистической обработки данных. Эффективность трансфекции оценивалась интегрально по двум параметрам: количеству трансфицированных клеток и их выживаемости. Клетки линии HeLa были взяты как одни из наиболее хорошо изученных модельных объектов для генной инженерии и внутриклеточной доставки. В качестве модельных агентов для доставки были выбраны: непенетрирующий флуоресцентный краситель пропидиум иодид (ПИ), а также ДНК-плазмиды, несущие гены флуоресцентных белков. Препаративное количество плазмид было наработано с помощью технологии молекулярного клонирования в клетках *E. coli*. Источником непрерывного лазерного облучения был 808 нм непрерывный лазер с расфокусированным пятном по диаметру облучаемой поверхности. В качестве импульсного источника использовалась установка с наносекундным 1064-нм лазерным излучателем с сильно фокусированным пучком с пятном около 3 мкм. Облучение проводили в 3D сканирующем режиме со скоростью сканирования 0.05 м/с, что обеспечивало расстояние между отдельными пачками импульсов 50–100 мкм. Длины волн выбранных источников располагаются вблизи плазмонного пика используемых монослоев наночастиц, и находятся в окне прозрачности биотканей, что минимизирует воздействие самого лазерного излучения на клетки. В результате проведенных серий экспериментов были найдены оптимальные параметры для эффективной внутриклеточной доставки молекул ПИ. Наиболее перспективными из всех протестированных типов частиц (наностержней, нанозвезд и наносфер) с различными характеристиками оказались монослой золотых нанозвезд с плазмонным резонансом 800 нм с поверхностной плотностью $Au \sim 15 \text{ мкг/см}^2$. Оптимальными параметрами двух выбранных источников лазерного излучения являются: температурный диапазон 42–45 °С, энергия облучения 75 Дж (интенсивность лазера, площадь и время облучения 1 Вт/см²; 0.5 см², и 150 с соответственно) для непрерывного лазера; энергия импульса 15 мкДж при длительности импульса 200 нс, частоте повторения 10 кГц для импульсного лазера.

Таким образом, представленный новый метод внутриклеточной доставки генетических конструкций, является простой и удобной системой с высокими параметрами эффективности и выживаемости клеток. Мы надеемся, что проведенные исследования 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.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (иммобилизация и характеристика монослоев наночастиц с заданными параметрами в рамках проекта № 18-14-00016, эксперименты по оптопорации клеток в рамках проекта № 17-74-10090).

ЛИТЕРАТУРА

- Glover D.J., Lipps H.J., Jans D.A. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans // *Nat Rev Genet.* 2005. V. 6 (4). P. 299–310.
- Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery // *Nat Rev Drug Discov* 2005. V. 4 (7). P. 581–93.
- Stewart M.P., Langer R., Jensen K.F. Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts // *Chem. Rev.* 2018. V. 118 (16). P. 7409–7531.
- Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. P. 2826–2885.
- Lakshmanan S., Gupta G.K., Avci P., Chandran R., Sadasivam M., Jorge A.E.S., Hamblin M.R. Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. V. 71. P. 98–114.
- Pylaev T., Vanzha E., Avdeeva E., Khlebtsov B., Khlebtsov N. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers // *Journal of Biophotonics*. 2019. V. 12. Art. No e201800166.
- 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. No 10336.
- Pylaev T., Avdeeva E., Khlebtsov B., Zakharevich A., Khlebtsov N. A novel centrifuge-based approach for tunable 2D layering of plasmonic nanoparticles // *Proc. SPIE*. 2018. No1106711.