

УДК 576.08,53.086

© С. В. Шмаков, З. Ф. Сосновицкая, В. М. Кондратьев,
А. С. Букатин, А. Д. Большаков, 2025

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК HeLa ПРИ КУЛЬТИВАЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НИТЕВИДНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ

В статье представлены результаты исследования выживаемости клеток культуры HeLa при их культивации на поверхности вертикального массива полупроводниковых нитевидных нанокристаллов (ННК). Показана выживаемость клеток при росте на поверхности ННК, сформированных из фосфида галлия со средней длиной 4 и 8 мкм, а также арсенида галлия со средней длиной 2 мкм. Демонстрируется возможность трансфекции клеток при культивации на массиве ННК путем прямого введения плазмиды в культуральную среду. Показана зависимость эффективности трансфекции от средней длины ННК.

Ключевые слова: нитевидные нанокристаллы, трансфекция, культура клеток, цитотоксичность

EDN: OCYABU

ВВЕДЕНИЕ

Трансфекция — доставка генетического материала в клетки эукарит — является одной из важнейших задач современных наук о жизни [1, 2]. В настоящее время существует множество решений, позволяющих осуществлять доставку молекул ДНК и РНК в клетки, однако все типы трансфекции можно разделить на два больших класса: физические и химические [3]. Сущность химических методов заключается в образовании способных к преодолению клеточной мембраны комплексов различных молекул, как правило, полимеров, обладающих липофильными свойствами, с молекулами нуклеиновых кислот [4]. Физические методы, такие как электропорация [5] или микроинъекция [6], доставляют целевые молекулы в клетки путем частичного и обратимого разрушения клеточной мембраны различными физическими воздействиями. Одним из существенных недостатков физических методов трансфекции является сложность масштабирования процедуры на большое количество образцов. Альтернативным способом создания физической системы трансфекции, позволяющим без затруднений работать с большим количеством образцов, является применение вертикальных массивов нанопроводов.

Нанопровода, или нитевидные нанокристаллы (ННК) представляют собой квазиодномерные наноструктуры с вертикальной геометрией, синтезированные на подложках различного состава [7]. В зависимости от желаемых свойств ННК могут быть сформированы из полупроводниковых, ди-

электрических либо металлических материалов [8, 9]. Современные методы синтеза, такие как молекулярно-пучковая эпитаксия [10] и химическое осаждение из газовой фазы [11], позволяют получать ННК с контролируемой геометрией, оптическими и электронными свойствами, находящие широкое применение в нанопотонике [12] или изготовлении различных газовых сенсоров [13]. Помимо этого, такие наноструктуры обладают потенциалом применения в области наук о жизни, включая создание биоинтерфейсов [14] биохимических сенсоров [15] визуализации клеток [16].

Целью данной работы является исследование биосовместимости и способности к трансфицированию клеток массива нитевидных нанокристаллов из полупроводников типа АЗВ5 на примере GaP и GaAs. Выбор таких материалов обусловлен оптическими и электрическими свойствами таких ННК, позволяющими потенциально создавать на их основе не только новые инструменты для трансфекции, но и оптические и электрические датчики для изучения состава внутриклеточной среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рост нитевидных нанокристаллов и их характеристика

Рост ННК проводился на установке Veeco GEN III MBE system (Veeco, США). Рост ННК проводился по автокаталитическому механизму (пар–жидкость–кристалл) на кремниевой подложке.

ке, содержащей слой поверхностного оксида SiO_x . Подробные условия роста описаны в работе [17]. Для дальнейшего исследования выживаемости и трансфекции клеток применялось три типа подложки: GaAs нитевидные нанокристаллы с характерной длиной 2 мкм, GaP ННК со средней длиной 4 мкм и GaP ННК со средней длиной

8 мкм. Средний диаметр ННК составляет от ~160 нм у подложки и ~150 нм около концевой части. Изображения соответствующих подложек, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, представлены на рис. 1. Морфология была охарактеризована на сканирующем электронном микроскопе Supra 2 (Carl Zeiss, Германия).

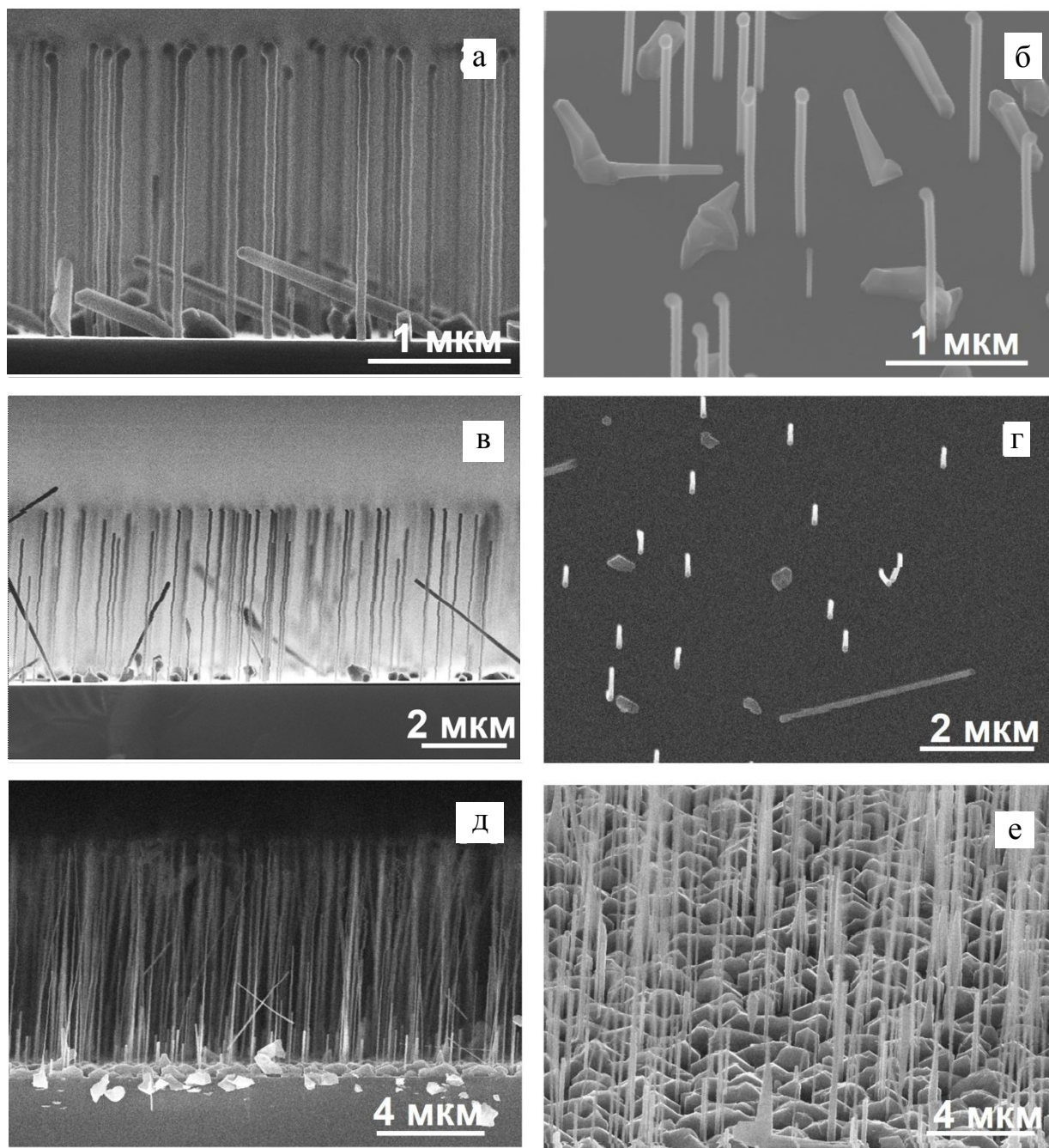


Рис. 1. Изображения применяемых в работе нитевидных нанокристаллов, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа.

а, б — ННК из арсенида галлия со средней длиной 2 мкм; в, г — ННК из фосфида галлия, средняя длина 4 мкм; д, е — образец ННК фосфида галлия, средняя длина 8 мкм

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК HeLa

Культура клеток

В ходе работы использовались клетки культуры HeLa (карцинома шейки матки человека). Культура была получена в Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. Клетки культивировались в среде DMEM (БиоЛот, Россия), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США), в присутствии антибиотика гентамицина (40 мкг/мл). Клетки культивировались в инкубаторе, в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, при температуре 37°C.

Исследование жизнеспособности клеток

Для исследования влияния ННК на жизнеспособность клеток в лунки 24-луночного культурального планшета помещались образцы кремниевых подложек со сформированными на их поверхности массивами ННК различной геометрии и состава. В качестве контрольного образца использовались чистые кремниевые подложки. В нормальном состоянии при контакте с воздухом поверхность подложки покрыта слоем диоксида кремния и, таким образом, по своим свойствам является близкой к стеклянным поверхностям для роста клеток. Площадь каждого образца составляла ~ 20 мм². Каждая лунка, содержащая подложку, с целью стерилизации обрабатывалась 70% раствором этанола в течение 20 мин. После этого для удаления спирта образцы трижды отмывались свежей культуральной средой. Затем в каждую лунку вносилось 500 мкл суспензии, содержащей клетки с концентрацией 1×10^6 клеток/мл, и планшет помещался в инкубатор. Через 24 ч в первую лунку, содержащую образец, добавлялся краситель Hoechst 33342, предназначенный для контрастирования ядра всех клеток, а также йодистый пропидий для контрастирования ядра мертвых клеток. Концентрация обоих красителей составляла 2 мкг/мл. Образцы инкубировались в течение 15 мин, затем промывались свежей средой, переносились на покровное стекло и анализировались на инвертированном микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с конфокальным модулем YokogawaCSU-X1 (Yokogawa, Япония). Процедура повторялась через 3, 5 и 7 дней после начала эксперимента. Для количественной характеристики жизнеспособности клеток подсчитывалось количество живых клеток, окрасившихся только красителем Hoechst 33342, а также количество мертвых клеток, окрасившихся как Hoechst 33342, так и йодидом пропидия. Выживаемость клеток подсчитывалась согласно формуле:

$$\% \text{ выживаемости} = \frac{n_{\text{образец}}}{n_{\text{контроль}}} \times 100,$$

где $n_{\text{образец}}$ — количество живых клеток в образце, $n_{\text{контроль}}$ — количество живых клеток в контроле соответствующего дня эксперимента.

Трансфекция

Первоначальная подготовка клеток и образцов совпадала с протоколом, описанным в предыдущем разделе. Через 24 ч после посева клеток на подложки ростовая среда удалялась из лунок и после трехкратной промывки фосфатно-солевым буфером заменялась на бесывороточную среду DMEM. После этого в среду добавлялась плазмида, кодирующая зеленый флуоресцентный белок GFP, в концентрации 1 нг/мл. Через сутки инкубации ядра клеток окрашивались красителем Hoechst 33342 и исследовались на конфокальном микроскопе.

Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки данных использовалась программа GraphPadPrism 8.0.1. Для расчета средних значений, среднеквадратичных отклонений и достоверности различий все эксперименты по исследованию выживаемости и трансфекции были выполнены трижды, для расчета значений P_{value} применялся t-тест Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выживаемость и жизнеспособность клеток

В работе были получены данные, свидетельствующие о высокой биосовместимости ННК на основе фосфида галлия и существенно более низкой выживаемости клеток при культивации на поверхности арсенида галлия. В случае культивации клеток на контрольной подложке (рис. 2, а–г) удвоение количества живых клеток наблюдается приблизительно через каждые 48 ч (рис. 2, к). Наблюдается рост от единичных клеток, равномерно распределенных по подложке, через 24 ч инкубации вплоть до образования монослоя на 7-й день роста. На 5-й день наблюдаются одиночные мертвые клетки, однако на 7-й день эксперимента мертвые клетки, т.е. клетки с ядром, окрашенным йодистым пропидием, не наблюдаются. Исчезновение мертвых клеток на 7-й день можно объяснить достижением конфлюэнтности, т.е. заполнением всего свободного пространства живыми клетками, что приводит к откреплению мертвых клеток от поверхности.

В случае культивации клеток на поверхности ННК их выживаемость и способность к пролиферации зависит как от морфологии подложки, так и от ее химического состава. Через 24 ч после рассева клеток во всех случаях наблюдается снижение количества живых клеток до 40% от кон-

трольного образца. Однако наблюдаемое количество мертвых клеток мало и составляет ~ 10% от общего количества клеток (рис. 2, д). Таким образом, возможным объяснением двукратного уменьшения количества клеток является не их гибель, а невозможность закрепления на поверхности

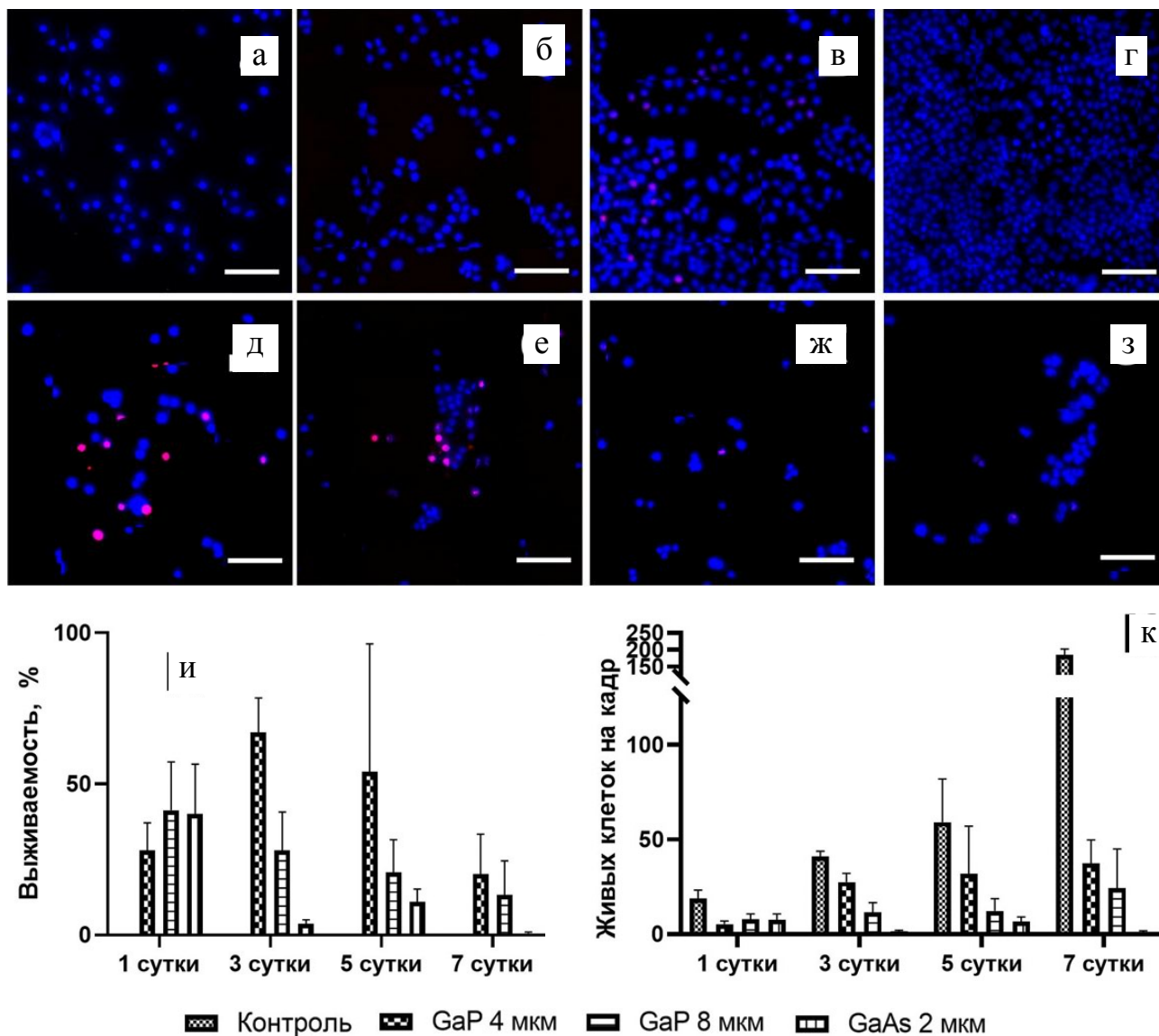


Рис. 2. Выживаемость клеток культуры HeLa при культивации на поверхности ННК различной морфологии и состава в течение 7 суток.

а–г: визуализации количества клеток на поверхности контрольного образца через 1, 3, 5, 7 суток культивации; д–з: визуализации количества клеток на поверхности 8 мкм GaP нанокристаллов через 1, 3, 5, 7 суток культивации. Светлые пятна — ядра клеток (окрашивание Hoechst 33342), более интенсивный белый цвет на д, е — комбинация красителей Hoechst 33342 и йодида пропидия, окрашивающего мертвые клетки.

и, к — гистограммы, демонстрирующие выживаемость и количество клеток на кадр при культивации клеток на различных подложках; шкала — 100 мкм

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК HeLa

массива ННК. На третий день эксперимента наблюдается падение выживаемости клеток на поверхности образца GaAs до 4%, в то время как клетки, растущие на поверхности образцов GaP 4 и 8 мкм, демонстрируют выживаемости $67 \pm 11\%$ и $28 \pm 13\%$ от контроля. Таким образом, можно сделать вывод о критическом влиянии материала ННК на выживаемость клеток. На пятый день эксперимента наблюдается плавное снижение выживаемости клеток на образцах GaP 4 и 8 мкм до 54 ± 42 и $20 \pm 11\%$. Несмотря на снижение выживаемости относительно контрольного образца, общее количество живых клеток увеличивается: на 3-й день культивации плотность клеток составила 27.5 ± 4.7 и 11.5 ± 5.2 на кадр для образцов GaP со средней длиной 4 и 8 мкм соответственно. На 5-е сутки плотность клеток на этих образцах составила 32 ± 25.3 и 12.3 ± 6.4 клеток на кадр. На 7-е сутки эксперимента продолжается постепенное сни-

жение выживаемости клеток при культивации на поверхности GaP ННК, однако количество клеток продолжает увеличиваться. Представленные данные позволяют сделать вывод, что нитевидные нанокристаллы с длиной до 8 мкм, хотя и снижают выживаемость при культивации клеток на их поверхности, но не вызывают гибели существенной части популяции.

Трансфекция

Возможность трансфекции клеток при их культивации на поверхности ННК исследовалась на примере культуры HeLa. Клетки культивировались на поверхности образцов GaP 4 и 8 мкм и GaAs 2 мкм, а также кремниевой планарной подложки, используемой в качестве контрольного образца. Полученные результаты представлены на рис. 3.

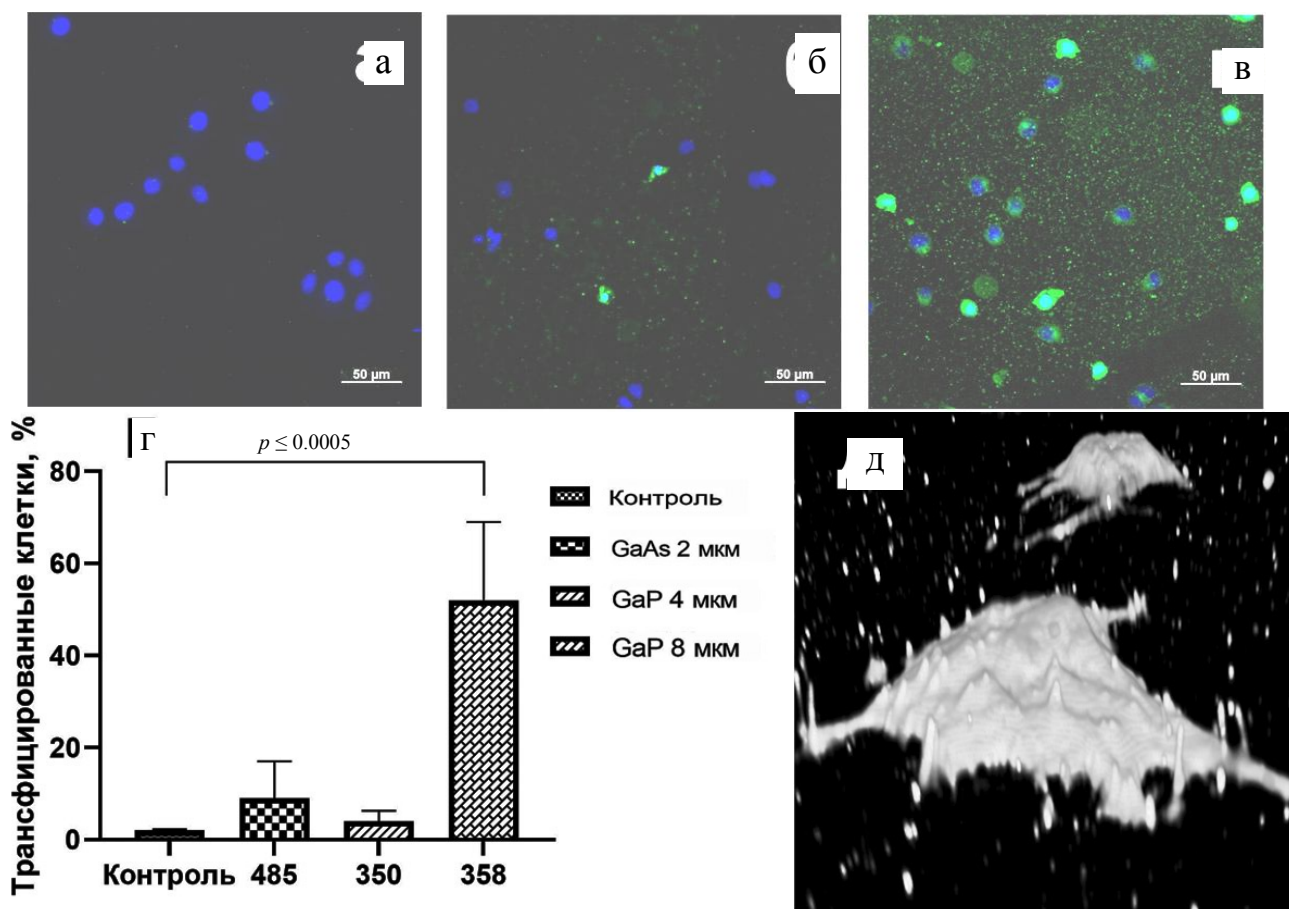


Рис. 3. Трансфекция клеток HeLa при культивации на поверхности ННК различной морфологии и состава. а — контрольный образец; б — GaAs ННК с характерной длиной 2 мкм; в — GaP ННК с характерной длиной 8 мкм. Светлые пятна — ядра клеток, прокрашенные Ноехст 33342, ярко-белые пятна — зеленый флуоресцентный белок GFP транскрибирующийся в клетке после попадания плазмиды; г — гистограмма, демонстрирующая процент трансфицированных клеток через 24 ч после введения плазмиды в культуральную среду; д — трехмерная реконструкция клетки HeLa, культивируемой на поверхности 8 мкм GaP ННК; наблюдаются проколы мембраны, формирующие обратимые поры, через которые плазмида попадает в клетку

На панелях а–в представлены микрофотографии клеток через 24 ч после введения в культуральную среду плазмиды, кодирующей ген зеленого флуоресцентного белка GFP. В случае контрольного образца плазмиды не способна преодолеть плазматическую мембрану, и зеленая флуоресценция в клетках отсутствует. При культивации клеток на поверхности GaAs ННК с характерной длиной 2 мкм наблюдается трансфекция единичных клеток. Наилучший результат был достигнут при использовании в качестве подложки для роста образца GaP 8 мкм. В этом случае эффективность трансфекции составила $52 \pm 17\%$. В случае культивации на поверхности GaP ННК с характерной длиной 4 мкм трансфекция практически не наблюдалась. Таким образом, как и в случае с анализом выживаемости клеток, можно заключить, что наряду с морфологическими характеристиками, в частности средней длиной нитевидных нанокристаллов, эффективность трансфекции зависит от химического состава ННК. На рис. 3, д, представлена трехмерная реконструкция клетки HeLa, культивирующейся на поверхности образца GaP 8 мкм, полученная методом конфокальной микроскопии. На изображении видны микроиглы, прокалывающие клетку. Это позволяет предположить, что механизм увеличения проницаемости плазматической мембраны, позволяющий молекулам ДНК проникнуть в клетку, заключается в формировании обратимых пор на месте проколов. Сравнивая полученные результаты с данными, продемонстрированными в предыдущих работах [20, 21], посвященных изучению трансфекции клеток на ННК, следует подчеркнуть, что трансфекция достигается путем прямого добавления плазмиды в культуральную среду в сравнении с предварительным нанесением плазмиды на поверхность ННК либо при электропорации, в случае которой нанокристаллы выступали в роли микроэлектродов.

ВЫВОДЫ

В работе исследована выживаемость клеток культуры HeLa на поверхности нитевидных нанокристаллов фосфида галлия с характерными длинами 4 и 8 мкм, а также арсенида галлия с характерной длиной 2 мкм. Показана зависимость выживаемости клеток как от морфологических характеристик ННК, так и от состава: нанокристаллы, сформированные из арсенида галлия обладают существенно большей токсичностью. Более короткие GaP ННК обладают большей биосовместимостью, однако при культивации клеток на 8 мкм GaP выживаемость составляет от 41% через 24 ч культивации до 16% на 7-е сутки.

Продemonстрирована трансфекция клеток, растущих на поверхности ННК, путем прямого введения плазмиды в культуральную среду. В случае 8 мкм GaP ННК эффективность трансфекции составила 52%. Сделан вывод о формировании обратимых пор в плазматической мембране, приведена трехмерная реконструкция серии конфокальных оптических срезов, демонстрирующая порирование мембраны нанокристаллами.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-24-00288

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010. Vol. 397. P. 3173–3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6
2. Liu X., Rong N., Tian Z., Rich J., Niu L., Li P., Zheng H. Acoustothermal transfection for cell therapy // *Science Advances*. 2024. Vol. 10, iss. 16. DOI: 10.1126/sciadv.adk1855
3. Wells-Holland C., Elfick A. Transfection reflections: fit-for-purpose delivery of nucleic acids // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2023. Vol. 24, iss. 11. P. 771–772. DOI: 10.1038/s41580-023-00627-6
4. Ben-Akiva E., Karlsson J., Hemmati S., Yu H., Tzeng S.Y., Pardoll D.M., Green J.J. Biodegradable lipophilic polymeric mRNA nanoparticles for ligand-free targeting of splenic dendritic cells for cancer vaccination // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023. Vol. 120, iss. 26. Id. e2301606120. DOI: 10.1073/pnas.2301606120
5. Kotnik T., Frey W., Sack M., Meglič S.H., Peterka M., Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology // *Trends in biotechnology*. 2015. Vol. 33, iss. 8. P. 480–488. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002
6. Chow Y.T., Chen S., Wang R., Liu C., Kong C.W., Li R.A., Sun D. Single cell transfection through precise microinjection with quantitatively controlled injection volumes // *Scientific reports*. 2016. Vol. 6, iss. 1. Id. 24127. DOI: 10.1038/srep24127
7. Barrigón E., Heurlin M., Bi Z., Monemar B., Samuelson L. Synthesis and applications of III–V nanowires // *Chem. Rev.* 2019. Vol. 119, iss. 15. P. 9170–9220. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00075
8. Sofiah A.G.N., Samykano M., Kadirgama K., Mohan R.V., Lah N.A.C. Metallic nanowires: mechanical properties – theory and experiment // *Applied Materials Today*. 2018. Vol. 11. P. 320–337. DOI: 10.1016/j.apmt.2018.03.004
9. Quan L.N., Kang J., Ning C.Z., Yang P. Nanowires for photonics // *Chemical reviews*. 2019. Vol. 119, iss. 15. P. 9153–9169. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00240
10. Werner P., Zakharov N.D., Gerth G., Schubert L., Gösele U. On the formation of Si nanowires by molecular

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК HeLa

- beam epitaxy // International journal of materials research. 2006. Vol. 97, iss. 7. P. 1008–1015. DOI: 10.1515/ijmr-2006-0159
11. Li B., Li H., Yao X., Zhu X., Liu N. Preparation and ablation resistance of ZrC nanowires-reinforced CVD-ZrC coating on sharp leading edge C/C composites // Applied Surface Science. 2022. Vol. 584. Id. 152617. DOI: 10.1016/j.apsusc.2022.152617
 12. Kim M., Park N., Lee H.J., Rho J. The latest trends in nanophotonics // Nanophotonics. 2022. Vol. 11, iss. 11. P. 2389–2392. DOI: 10.1515/nanoph-2022-0191
 13. Lu S., Zhang Y., Liu J., Li H.Y., Hu Z., Luo X., Liu H. Sensitive H₂ gas sensors based on SnO₂ nanowires // Sensors and Actuators B: Chemical. 2021. Vol. 345. Id. 130334. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130334
 14. Shi J., Sun C., Liang E., Tian B. Semiconductor nanowire-based cellular and subcellular interfaces // Advanced Functional Materials. 2022. Vol. 32, iss. 11. Id. 2107997. DOI: 10.1002/adfm.202107997
 15. Rajan N.K., Routenberg D.A., Reed M.A. Optimal signal-to-noise ratio for silicon nanowire biochemical sensors // Applied physics letters. 2011. Vol. 98, iss. 26. Id. 264107. DOI: 10.1063/1.3608155
 16. Rahong S., Yasui T., Kaji N., Baba Y. Recent developments in nanowires for bio-applications from molecular to cellular levels // Lab on a Chip. 2016. Vol. 16, iss. 7. P. 1126–1138. DOI: 10.1039/C5LC01306B
 17. Harberts J., Bours K., Siegmund M., Hedrich C., Glatza M., Schöler H.R., Blick R.H. Culturing human iPSC-derived neural progenitor cells on nanowire arrays: mapping the impact of nanowire length and array pitch on proliferation, viability, and membrane deformation // Nanoscale. 2021. Vol. 13, iss. 47. P. 20052–20066. DOI: 10.1039/D1NR04352H
 18. Kim Y.J., Yoo C.J., Lee U., Yoo Y.M. Cytotoxicity of gold nanorods and nanowires on cultivated neural precursor cells // Journal of nanoscience and nanotechnology. 2015. Vol. 15, iss. 8. P. 5617–5623. DOI: 10.1166/jnn.2015.10612
 19. Fedorov V.V., Bolshakov A.D., Dvoretckaja L.N., Sapunov G.A., Kirilenko D.A., Mozharov A.M., Shugurov K.Yu., Shkoldin V.A., Cirlin G.E., Mukhin I.S. Self-catalyzed mbe-grown gap nanowires on Si (111): V/III ratio effects on the morphology and crystal phase switching // Semiconductors. 2018. Vol. 52, iss. 16. P. 2092–2095. DOI: 10.1134/S106378261816008X
 20. Shalek A.K., Robinson J.T., Karp E.S., Lee J.S., Ahn D.R., Yoon M.H., Park H. Vertical silicon nanowires as a universal platform for delivering biomolecules into living cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 107, iss. 5. P. 1870–1875. URL: <https://www.pnas.org/cms/asset/a0914056-abd0-4e0d-ae5d-e8e4260cb9e2/pnas.2010.107.issue-5.toc.pdf>
 21. Choi S.O., Kim Y.C., Lee J.W., Park J.H., Prausnitz M.R., Allen M.G. Intracellular protein delivery and gene transfection by electroporation using a microneedle electrode array // Small. 2012. Vol. 8, iss. 7. P. 1081–1091. DOI: 10.1002/smll.201101747

Санкт-Петербургский академический университет им. Ж.И. Алферова РАН, Санкт-Петербург, Россия (Шмаков С.В., Сосновицкая З.Ф., Кондратьев В.М., Букатин А.С., Большаков А.Д.)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия (Кондратьев В.М., Большаков А.Д.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия (Букатин А.С.)

Ереванский государственный университет, Ереван, Республика Армения (Большаков А.Д.)

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия (Большаков А.Д.)

Контакты: Шмаков Станислав Витальевич, stas-svs@list.ru

Материал поступил в редакцию 12.12.2024

VIABILITY AND TRANSFECTION OF HeLa CELLS ON THE SURFACE OF SEMICONDUCTOR NANOWIRES

S. V. Shmakov¹, Z. F. Sosnovitskaia¹, V. M. Kondratev^{1,2},
A. S. Bukatin^{1,3}, A. D. Bolshakov^{1,2,4,5}

¹Alferov University, St. Petersburg, Russia.

²MIPT, Moscow, Russia

³Institute for Analytical Instrumentation of the RAS, St. Petersburg, Russia

⁴Yerevan State University, Armenia

⁵St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

The article presents the results of a study of the viability of HeLa cells during their cultivation on the surface of a vertical array of semiconductor nanowires (NWs). The viability of cells during growth on the surface of NWs formed from gallium phosphide with an average length of 4 and 8 μm , as well as gallium arsenide with an average length of 2 μm , is shown. The possibility of transfection of cells during cultivation on an NW array by direct introduction of a plasmid into the culture medium is demonstrated. The dependence of transfection efficiency on the average NW length is shown.

Keywords: nanowires, transfection, cell culture, cytotoxicity

REFERENCES

- Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, vol. 397, pp. 3173–3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6
- Liu X., Rong N., Tian Z., Rich J., Niu L., Li P., Zheng H. Acoustothermal transfection for cell therapy. *Science Advances*, 2024, vol. 10, iss. 16. DOI: 10.1126/sciadv.adk1855
- Wells-Holland C., Elfick A. Transfection reflections: fit-for-purpose delivery of nucleic acids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, vol. 24, iss. 11, pp. 771–772. DOI: 10.1038/s41580-023-00627-6
- Ben-Akiva E., Karlsson J., Hemmati S., Yu H., Tzeng S.Y., Pardoll D.M., Green J.J. Biodegradable lipophilic polymeric mRNA nanoparticles for ligand-free targeting of splenic dendritic cells for cancer vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2023, vol. 120, iss. 26, id. e2301606120. DOI: 10.1073/pnas.2301606120
- Kotnik T., Frey W., Sack M., Meglič S.H., Peterka M., Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 2015, vol. 33, iss. 8, pp. 480–488. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002
- Chow Y.T., Chen S., Wang R., Liu C., Kong C.W., Li R.A., Sun D. Single cell transfection through precise microinjection with quantitatively controlled injection volumes. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, iss. 1, id. 24127. DOI: 10.1038/srep24127
- Barrigón E., Heurlin M., Bi Z., Monemar B., Samuelson L. Synthesis and applications of III–V nanowires. *Chem. Rev.*, 2019, vol. 119, iss. 15, pp. 9170–9220. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00075
- Sofiah A.G.N., Samykano M., Kadigama K., Mohan R.V., Lah N.A.C. Metallic nanowires: mechanical properties –theory and experiment. *Applied Materials Today*, 2018, vol. 11, pp. 320–337. DOI: 10.1016/j.apmt.2018.03.004
- Quan L.N., Kang J., Ning C.Z., Yang P. Nanowires for photonics. *Chemical reviews*, 2019, vol. 119, iss. 15, pp. 9153–9169. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00240
- Werner P., Zakharov N.D., Gerth G., Schubert L., Gösele U. On the formation of Si nanowires by molecular beam epitaxy. *International journal of materials research*, 2006, vol. 97, iss. 7, pp. 1008–1015. DOI: 10.1515/ijmr-2006-0159
- Li B., Li H., Yao X., Zhu X., Liu N. Preparation and ablation resistance of ZrC nanowires-reinforced CVD-ZrC coating on sharp leading edge C/C composites. *Applied Surface Science*, 2022, vol. 584, id. 152617. DOI: 10.1016/j.apsusc.2022.152617
- Kim M., Park N., Lee H.J., Rho J. The latest trends in nanophotonics. *Nanophotonics*, 2022, vol. 11, iss. 11, pp. 2389–2392. DOI: 10.1515/nanoph-2022-0191
- Lu S., Zhang Y., Liu J., Li H.Y., Hu Z., Luo X., Liu H. Sensitive H₂ gas sensors based on SnO₂ nanowires. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, vol. 345, id. 130334. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130334
- Shi J., Sun C., Liang E., Tian B. Semiconductor nanowire-based cellular and subcellular interfaces. *Advanced Functional Materials*, 2022, vol. 32, iss. 11, id. 2107997. DOI: 10.1002/adfm.202107997
- Rajan N.K., Routenberg D.A., Reed M.A. Optimal signal-to-noise ratio for silicon nanowire biochemical sensors. *Applied physics letters*, 2011, vol. 98, iss. 26, id. 264107. DOI: 10.1063/1.3608155
- Rahong S., Yasui T., Kaji N., Baba Y. Recent developments in nanowires for bio-applications from molecular to

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК HeLa

- cellular levels. *Lab on a Chip*, 2016, vol. 16, iss. 7, pp. 1126–1138. DOI: 10.1039/C5LC01306B
17. Harberts J., Bours K., Siegmund M., Hedrich C., Glatza M., Schöler H.R., Blick R.H. Culturing human iPSC-derived neural progenitor cells on nanowire arrays: mapping the impact of nanowire length and array pitch on proliferation, viability, and membrane deformation. *Nanoscale*, 2021, vol. 13, iss. 47, pp. 20052–20066. DOI: 10.1039/D1NR04352H
 18. Kim Y.J., Yoo C.J., Lee U., Yoo Y.M. Cytotoxicity of gold nanorods and nanowires on cultivated neural precursor cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2015, vol. 15, iss. 8, pp. 5617–5623. DOI: 10.1166/jnn.2015.10612
 19. Fedorov V.V., Bolshakov A.D., Dvoretckaia L.N., Sapunov G.A., Kirilenko D.A., Mozharov A.M., Shugurov K.Yu., Shkoldin V.A., Cirlin G.E., Mukhin I.S. Self-catalyzed mbe-grown gap nanowires on Si (111): V/III ratio effects on the morphology and crystal phase switching. *Semiconductors*, 2018, vol. 52, iss. 16, pp. 2092–2095. DOI: 10.1134/S106378261816008X
 20. Shalek A.K., Robinson J.T., Karp E.S., Lee J.S., Ahn D.R., Yoon M.H., Park H. Vertical silicon nanowires as a universal platform for delivering biomolecules into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, iss. 5, pp. 1870–1875. URL: <https://www.pnas.org/cms/asset/a0914056-abd0-4e0d-ae5d-e8e4260cb9e2/pnas.2010.107.issue-5.toc.pdf>
 21. Choi S.O., Kim Y.C., Lee J.W., Park J.H., Prausnitz M.R., Allen M.G. Intracellular protein delivery and gene transfection by electroporation using a microneedle electrode array. *Small*, 2012, vol. 8, iss. 7, pp. 1081–1091. DOI: 10.1002/sml.201101747

Contacts: *Shmakov Stanislav Vitalevich*,
stas-svs@list.ru

Article received by the editorial office on 12.12.2024

INTRODUCTION

Transfection — delivery of genetic material into eukaryotic cells — is one of the most important tasks of modern life sciences [1, 2]. Currently, there are many solutions that allow the delivery of DNA and RNA molecules into cells, but all types of transfection can be divided into two large classes: physical and chemical [3]. The essence of chemical methods lies in the formation of complexes — capable of overcoming the cell membrane — of various molecules, usually polymers with lipophilic properties, with nucleic acid molecules [4]. Physical methods, such as electroporation [5] or microinjection [6], deliver target molecules into cells by partial and reversible destruction of the cell membrane by various physical effects. One of the significant drawbacks of physical transfection methods is the difficulty of scaling the procedure to a large number of samples. An alternative way to create a physical transfection system that allows one to work without difficulty with a large number of samples is to use vertical arrays of nanowires.

Nanowires (NWs) are quasi-one-dimensional nanostructures with vertical geometry synthesized on substrates of various compositions [7]. Depending on the desired properties, NWs can be formed from semiconductor, dielectric, or metallic materials [8, 9]. Modern synthesis methods such as molecular beam epitaxy [10] and chemical vapor deposition [11] make it possible to obtain NWs with controlled geometry, optical, and electronic properties, which are widely used in nanophotonics [12] or the manufacture of various gas sensors [13]. In addition, such nanostructures have potential for use in life sciences, including the creation of biointerfaces [14], biochemical sensors [15], and cell imaging [16].

The aim of this work is to study the biocompatibility and cell transfection ability of an array of nanowires made of A3B5 semiconductors using GaP and GaAs as an example. The choice of such materials is due to the optical and electrical properties of such NWs, which make it possible to potentially create not only new transfection tools but also optical and electrical sensors for studying the composition of the intracellular environment.

MATERIALS AND METHODS

Growth of nanowires and their characterization

NW growth was performed using a Veeco GEN III MBE system (Veeco, USA). NW growth was performed using an autocatalytic subsequence (vapor – liquid – crystal) on a silicon substrate containing a layer of surface oxide SiO_x. Detailed growth conditions are described in [17]. For further study of cell survival and transfection, three types of substrate were

used: GaAs nanowires with a characteristic length of 2 μm , GaP NWs with an average length of 4 μm , and GaP NWs with an average length of 8 μm . The average diameter of the NWs is ~ 160 nm at the substrate and ~ 150 nm near the end part. Scanning electron microscopy images of the corresponding substrates are shown in Fig. 1. The morphology was characterized using a Supra 2 scanning electron microscope (Carl Zeiss, Germany).

Fig. 1. Images of NWs used in the work, obtained using a scanning electron microscope.

a, б — NWs from gallium arsenide with an average length of 2 μm ; в, г — NWs from gallium phosphide, average length 4 μm ; д, е — a sample of NWs from gallium phosphide, average length 8 μm

Cell culture

Cell culture HeLa cells (human cervical carcinoma) were used in the study. The culture was obtained from the Russian Collection of Vertebrate Cell Cultures, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg. The cells were cultured in DMEM medium (BioLot, Russia) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA) in the presence of gentamicin antibiotic (40 $\mu\text{g/ml}$). The cells were cultured in an incubator in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at a temperature of 37 $^{\circ}\text{C}$.

Cell viability study

To study the effect of NWs on cell viability, samples of silicon substrates with NW arrays of various geometries and compositions formed on their surface were placed in the wells of a 24-well culture plate. Pure silicon substrates were used as a control sample. In the normal state, during contact with air, the substrate surface is covered with a layer of silicon dioxide and, thus, by its properties, is close to glass surfaces for cell growth. The area of each sample was ~ 20 mm². Each well containing the substrate was treated with a 70% ethanol solution for 20 min for sterilization. After this, the samples were washed three times with fresh culture medium to remove alcohol. Then 500 μl of a suspension containing cells with a concentration of $1 \cdot 10^6$ cells/ml were added to each well, and the plate was placed in an incubator. After 24 h, Hoechst 33342 dye intended for contrasting the nuclei of all cells was added to the first well containing the sample, as well as propidium iodide was added to contrast the nuclei of dead cells. The concentration of both dyes was 2 $\mu\text{g/ml}$. Samples were incubated for 15 min, then washed with fresh medium, transferred to a cover glass, and analyzed using an Axio Observer.Z1 inverted microscope (Carl

Zeiss, Germany) with a Yokogawa CSU-X1 confocal module (Yokogawa, Japan). The procedure was repeated 3, 5, and 7 days after the start of the experiment. To quantitatively characterize cell viability, the number of living cells stained only with Hoechst 33342, as well as the number of dead cells stained with both Hoechst 33342 and propidium iodide, were counted. Cell viability was calculated according to the formula:

$$\% \text{viability} = \frac{n_{\text{образец}}}{n_{\text{контроль}}} \times 100,$$

where $n_{\text{образец}}$ is the number of living cells in the sample, $n_{\text{контроль}}$ is the number of living cells in the reference of the corresponding day of the experiment.

Transfection

The initial preparation of cells and samples was the same as described in the previous section. After 24 h of seeding the cells on the substrates, the growth medium was removed from the wells and, after three washes with phosphate-buffered saline, replaced with serum-free DMEM. After that, the plasmid encoding the green fluorescent protein GFP was added to the medium at a concentration of 1 ng/ml. After 24 h of incubation, the cell nuclei were stained with Hoechst 33342 and examined using a confocal microscope.

Statistical processing of results

GraphPadPrism 8.0.1 was used for statistical processing of the data. All survival and transfection experiments were performed three times to calculate the mean values, standard deviations, and significance of differences; Student's t-test was used to calculate the P_{value} .

RESULTS

Cell survival and viability

The data obtained in the work indicate high biocompatibility of gallium phosphide-based NWs and significantly lower cell survival when cultivated on a gallium arsenide surface. In the case of cell cultivation on a reference substrate (Fig. 2, a–r), a doubling of the number of living cells is observed approximately every 48 h (Fig. 2, k). Growth is observed from single cells uniformly distributed over the substrate after 24 h of incubation up to the formation of a monolayer on the 7th day of growth. Single dead cells are observed on the 5th day, however, on the 7th day of the experiment, dead cells, i.e., cells with a nucleus stained with propidium iodide, are not observed. The disappearance of dead cells on the 7th day can be explained by the achievement of confluency, i.e., filling all free space

with living cells, which leads to the detachment of dead cells from the surface.

Fig. 2. Survival of HeLa cells during cultivation on the surface of NWs of different morphology and composition for 7 days.

a–r: visualization of the number of cells on the surface of the reference sample after 1, 3, 5, 7 days of cultivation;

д–з: visualization of the number of cells on the surface of 8 μm GaP nanocrystals after 1, 3, 5, 7 days of cultivation.

Light spots are cell nuclei (Hoechst 33342 staining), a more intense white color in д, e is a combination of Hoechst 33342 dyes and propidium iodide, which stains dead cells.

и, к — histograms demonstrating the survival and number of cells per frame during cell cultivation on different substrates; scale bar — 100 μm

In the case of cell cultivation on the NW surface, their survival and ability to proliferate depend both on the morphology of the substrate and on its chemical composition. 24 h after cell seeding, in all cases, a decrease in the number of living cells to 40% of the reference sample is observed. However, the observed number of dead cells is small and amounts to $\sim 10\%$ of the total number of cells (Fig. 2, д). Thus, a possible explanation for the twofold decrease in the number of cells is not their death but the inability to attach to the NW array surface. On the third day of the experiment, a drop in cell survival on the surface of the GaAs sample to 4% is observed, while cells growing on the surface of the 4 and 8 μm GaP samples demonstrate survival rates of $67 \pm 11\%$ and $28 \pm 13\%$ of the reference. Thus, it can be concluded that the NW material has a critical effect on cell survival. On the fifth day of the experiment, a smooth decrease in cell survival on the 4 and 8 μm GaP samples to 54 ± 42 and $20 \pm 11\%$ is observed. Despite the decrease in survival relative to the reference sample, the total number of living cells increases: on the 3rd day of cultivation, the cell density was 27.5 ± 4.7 and 11.5 ± 5.2 per frame for GaP samples with an average length of 4 and 8 μm , respectively. On the 5th day, the cell density on these samples was 32 ± 25.3 and 12.3 ± 6.4 cells per frame. On the 7th day of the experiment, the gradual decrease in cell survival during cultivation on the GaP NW surface continues, but the number of cells continues to increase. The presented data allow us to conclude that filiform nanocrystals with a length of up to 8 μm reduce the survival rate during cell cultivation on their surface and do not cause the death of a significant part of the population.

Transfection

The possibility of transfection of cells during their cultivation on the NW surface was studied using the example of the HeLa culture. The cells were cultured on the surface of GaP 4 and 8 μm and GaAs 2 μm samples, as well as a silicon planar substrate used as a control sample. The results obtained are shown in Fig. 3.

Fig. 3. Transfection of HeLa cells during cultivation on the surface of NWs of different morphology and composition.

a — reference sample; б — GaAs NWs with a characteristic length of 2 μm ; в — GaP NWs with a characteristic length of 8 μm . Light spots — cell nuclei stained with Hoechst 33342, bright white spots — green fluorescent protein GFP transcribed in the cell after plasmid introduction; г — histogram demonstrating the percentage of transfected cells 24 h after plasmid introduction into the culture medium; д — three-dimensional reconstruction of HeLa cell cultured on the surface of 8 μm GaP NWs; membrane punctures are observed, forming reversible pores through which the plasmid enters the cell

Figures a–в show micrographs of cells 24 h after the introduction of the plasmid encoding the green fluorescent protein GFP gene into the culture medium. In the case of the reference sample, the plasmid is unable to permeate the plasma membrane, and green fluorescence is absent in the cells. When culturing cells on the surface of GaAs NWs with a characteristic length of 2 μm , transfection of single cells is observed. The best result was achieved when using an 8 μm GaP sample as a substrate for growth. In this case, the transfection efficiency was $52 \pm 17\%$. In the case of culturing NWs with a characteristic length of 4 μm on the GaP surface, transfection was practically not observed. Thus, as in the case of the cell survival analysis, it can be concluded that, along with morphological characteristics, in particular the average length

of the nanowires, the transfection efficiency depends on the chemical composition of the NWs. Fig. 3, д, shows a three-dimensional reconstruction of a HeLa cell cultured on the surface of an 8 μm GaP sample obtained by confocal microscopy. The image shows microneedles piercing the cell. This suggests that the algorithm for increasing the permeability of the plasma membrane, allowing DNA molecules to penetrate the cell, is the formation of reversible pores at the puncture sites. Comparing the obtained results with the data demonstrated in previous studies [20, 21] devoted to the study of cell transfection on NWs, it should be emphasized that transfection is achieved by direct addition of the plasmid to the culture medium in comparison with preliminary application of the plasmid to the NW surface or by electroporation, when the nanocrystals acted as microelectrodes.

CONCLUSIONS

The work investigated the survival of HeLa cells on the surface of gallium phosphide nanowires with characteristic lengths of 4 and 8 μm , as well as gallium arsenide with a characteristic length of 2 μm . The dependence of cell survival on both the morphological characteristics of the NWs and their composition was shown: nanocrystals formed from gallium arsenide have significantly higher toxicity. Shorter GaP NWs have greater biocompatibility, but when culturing cells on 8 μm GaP, the survival rate ranges from 41% after 24 hours of cultivation to 16% on the 7th day.

Transfection of cells growing on the surface of NWs by direct introduction of a plasmid into the culture medium was demonstrated. In the case of 8 μm GaP NWs, the transfection efficiency was 52%. A conclusion is made about the formation of reversible pores in the plasma membrane, a three-dimensional reconstruction of a series of confocal optical sections is presented, demonstrating the porization of the membrane by nanocrystals.