

study of 565 apparently normal individuals with fluorescent *in situ* hybridization. PLoS One. 2009;4(6):e5855. DOI:10.1371/journal.pone.0005855

33. Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, et al. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. Genome Res. 2001;11(3):483-496. DOI:10.1101/gr.169601.

34. Yamada NA, Rector LS, Tsang P, et al. Visualization of fine-scale genomic structure by oligonucleotide-based high-resolution FISH. Cytogenet Genome Res. 2011;132(4):248-54. DOI:10.1159/000322717

35. Beliveau BJ, Joyce EF, Apostolopoulos N, et al. Versatile design and synthesis platform for visualizing genomes with Oligopaint FISH probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(52):21301-6. DOI:10.1073/pnas.1213818110

36. Takei Y, Yun J, Zheng S, et al. Integrated spatial genomics reveals global architecture of single nuclei. Nature. 2021;590(7845):344-50. DOI:10.1038/s41586-020-03126-2

37. Andrade BLF, Lopes ALG, Teixeira GA, Tavares MG. Karyotypes and chromosomal mapping of some repetitive dnas in two stingless bee species (apidae: Meliponini), with the description of a B chromosome in plebeia genus. Cytogenet Genome Res. 2024;164(5-6):267-75. DOI:10.1159/000542295

38. Hausmann M, Lee JH, Sievers A, et al. COMBinatorial Oligonucleotide FISH (COMBO-FISH) with uniquely binding repetitive dna probes. Methods Mol Biol. 2020;2175:65-77. DOI:10.1007/978-1-0716-0763-3\_6

39. Anderson R. Multiplex fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH). Methods Mol Biol. 2010;659:83-97. DOI:10.1007/978-1-60761-789-1\_6

40. Onozato ML, Yapp C, Richardson D, et al. Highly multiplexed fluorescence *in situ* hybridization for *in situ* genomics. J Mol Diagn. 2019;21(3):390-407. DOI:10.1016/j.jmoldx.2019.01.010

41. Liehr T, Starke H, Weise A, et al. Multicolor FISH probe sets and their applications. Histol Histopathol. 2004;19(1):229-37. DOI:10.14670/HH-19.229

42. Yan Y, Liheng Y, Leyuan M, et al. Introduction to bioimaging-based spatial multi-omic novel methods. Quantitative Biol. 2023;11:231-45. DOI:10.15302/J-QB-023-0332

43. Anderson T, Hartman S, Dunn W, et al. Technical comparison of Abbott's UroVysion® and Biocare's CytoFISH urine fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays. Cancer Cell Int. 2023;23(1):314. DOI:10.1186/s12935-023-03156-6

44. Kwon GJ, Blackley A, Perkinson K, et al. Automation of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) leading to cost savings and consistent high-quality results. J Clin Pathol. DOI:10.1136/jcp-2025-210119

45. Martinez G, Gillois P, Le Mitouard M, et al. FISH and tips: A large scale analysis of automated versus manual scoring for sperm aneuploidy detection. Basic Clin Androl. 2013;23:13. DOI:10.1186/2051-4190-23-13

46. Sugita S, Aoyama T, Ito Y, et al. Diagnostic utility of automated SureFISH (Dako Omnis) in the diagnosis of musculoskeletal translocation-related sarcomas. Pathol Int. 2017;67(10):510-3. DOI:10.1111/pin.12562

47. Soler M, Boque-Sastre R, Guil S. RNA-FISH to study regulatory RNA at the site of transcription. Methods Mol Biol. 2017;1543:221-9. DOI:10.1007/978-1-4939-6716-2\_12

48. Quijada-Álamo M, Hernández-Sánchez M, Robledo C, et al. Next-generation sequencing and FISH studies reveal the appearance of gene mutations and chromosomal abnormalities in hematopoietic progenitors in chronic lymphocytic leukemia. J Hematol Oncol. 2017;10(1):83. DOI:10.1186/s13045-017-0450-y

49. Suh J, Liu Y, Smith J, Watanabe M, et al. A simple and fast optical clearing method for whole-mount fluorescence *in situ* hybridization (FISH) Imaging. J Biophotonics. 2025;18(12):e202400258. DOI:10.1002/jbio.202400258

50. Vorsanova SG, Yurov YB, Iourov IY. Quantitative FISHing: Implications for Chromosomal Analysis. Methods Mol Biol. 2024;2825:239-46. DOI:10.1007/978-1-0716-3946-7\_13

Статья поступила в редакцию 19.11.2025; одобрена после рецензирования 27.11.2025; принята к публикации 28.11.2025. The article was submitted 19.11.2025; approved after reviewing 27.11.2025; accepted for publication 28.11.2025.

#### Информация об авторах:

**Тимофей Евгеньевич Пылаев** – директор научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, кандидат биологических наук, [pylaevte@gmail.com](mailto:pylaevte@gmail.com), ORCID 0000-0002-2701-3333; **Сергей Сергеевич Веретенников** – младший научный сотрудник научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, [sergejj-veretennikov0@rambler.ru](mailto:sergejj-veretennikov0@rambler.ru).

#### Information about the authors:

**Timofey E. Pylaev** – Director of the Research, Production and Educational Center for Molecular Genetic and Cellular Technologies, PhD, [pylaevte@gmail.com](mailto:pylaevte@gmail.com), ORCID 0000-0002-2701-3333; **Sergey S. Veretennikov** – Junior Researcher of the Research, Production and Educational Center for Molecular Genetic and Cellular Technologies, [sergejj-veretennikov0@rambler.ru](mailto:sergejj-veretennikov0@rambler.ru).

УДК 576.53+535.374+541.18.535+577.323.23

EDN: CIDTIL

<https://doi.org/10.15275/ssmj2104513>

Краткое сообщение

## СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ГЕНОМА МЕТОДОМ ПЛАЗМОННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ТРАНСФЕКЦИИ

**Т.Е. Пылаев**

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия

## STRATEGY FOR CREATING BIOMEDICAL CELL-BASED PRODUCTS BASED ON GENOME EDITING VIA PLASMONIC LASER TRANSFECTION

**T.E. Pylaev**

V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Для цитирования: Пылаев Т.Е. Стратегия создания биомедицинских клеточных продуктов на основе репрограммирования генома методом плазмонной лазерной трансфекции. Саратовский научно-медицинский журнал. 2025; 21 (4): 509-513. EDN: CIDTIL. <https://doi.org/10.15275/ssmj2104513>.

**Аннотация.** *Цель:* адаптация технологии репрограммирования генома на основе лазерной трансфекции для создания биомедицинских клеточных продуктов. *Материал и методы.* В работе использованы разработанные платформы для оптотрансфекции на основе многолуночных культуральных планшетов с покрытием рабочей поверхности монослоем наночастиц золота. Модельные клеточные эксперименты по доставке молекулярного агента пропидиум иодида выполнены на клетках мышинных макрофагов линии RAW 264.7. Трансфекцию клеточных монослоев, адгезированных на платформах 24-луночных планшетов со слоями нанозвезд золота, проводили путем однократного 2D-сканирования импульсным лазером с узкофокусированным пучком. Оценку жизнеспособности и эффективности модификации клеток проводили посредством прямой микроскопии и с применением метаболических тестов. *Результаты.* Определены оптимальные рабочие режимы лазерной оптотрансфекции клеток макрофагов мыши RAW 264.7: энергия импульса – 1,4 мкДж, длительность импульса – 200 нс, скважность импульса – 10 кГц, скорость сканирования – 0,025 м/с. Выявлены значения минимальной стартовой конфлюэнтности монослоя 40%, эффективности трансфекции  $78 \pm 7,6\%$  жизнеспособности клеток  $84 \pm 9,3\%$ . *Заключение.* В условиях модельных экспериментов *in vitro* продемонстрирована возможность тонкой регуляции параметров оптотрансфекции для обеспечения воспроизводимых результатов генетической модификации лимфоцитоподобных клеток с высокими показателями эффективности и жизнеспособности.

**Ключевые слова:** CAR-T-терапия, невирусная трансфекция, оптопорация, наночастицы золота, генная терапия, химерные Т-клетки

**For citation:** Pylaev TE. Strategy for creating biomedical cell-based products based on genome editing via plasmonic laser transfection. *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2025; 21 (4): 509–513. (In Russ.) EDN: CIDTIL. <https://doi.org/10.15275/ssmj2104513>.

**Abstract.** *Objective:* adaptation of genome reprogramming technology based on laser transfection to create biomedical cell products. *Material and methods.* We developed optotransfection platforms based on multi-well culture plates with the working surface coated with gold nanoparticle monolayers. Model cell experiments on the delivery of the molecular agent propidium iodide were conducted using the mice macrophage cells, line RAW 264.7. Transfection of cell monolayers adhered to 24-well plate platforms with gold nanostar layers was carried out via single 2-D scanning with a pulsed laser and narrowly focused beam. The viability and efficiency of cell modification were assessed by direct microscopy and metabolic tests. *Results.* The optimal operating modes for laser optotransfection of RAW 264.7 mouse macrophage cells were determined, namely: pulse energy 1.4  $\mu$ J, pulse duration 200 ns, pulse frequency 10 kHz, scanning speed 0.025 m/s. The minimum starting monolayer confluency was 40%, the transfection efficiency was  $78 \pm 7.6\%$ , and the cell viability was  $84 \pm 9.3\%$ . *Conclusion.* Under controlled model *in vitro* experiments, it has been demonstrated that fine adjustment of optotransfection parameters enables reproducible results of genetic modification in lymphocyte-like cells, achieving high levels of both efficiency and viability.

**Keywords:** CAR-T therapy, non-viral transfection, optoporation, gold nanoparticles, gene therapy, chimeric T cells

**Введение.** Современная медицина демонстрирует тенденцию к разработке персонализированных, высокоспецифичных и эффективных терапевтических подходов, среди которых особое место занимают индивидуальные биомедицинские клеточные продукты (ИБМКП) на основе генетически перепрограммированных лимфоцитов. Стратегия создания клеточных терапевтических препаратов стала особенно актуальной с клинической реализацией CAR-T-клеточной иммунотерапии (chimeric antigen receptor T cell immunotherapy), показавшей значительные перспективы в профилактике, диагностике и лечении гемобластозов в резистентных/рецидивирующих формах [1]. Принцип технологии основан на изоляции Т-лимфоцитов из периферической крови с последующей их генетической модификацией, направленной на экспрессию химерных антигенных рецепторов. Полученный клеточный продукт, реинфузированный пациенту, обладает способностью к таргетной деструкции опухолевых клеток. Таким образом, данная методология преобразует аутологичные клетки в терапевтическую систему направленного действия, обеспечивая способность лимфоцитов к специфическому распознаванию и элиминации неопластических клеток.

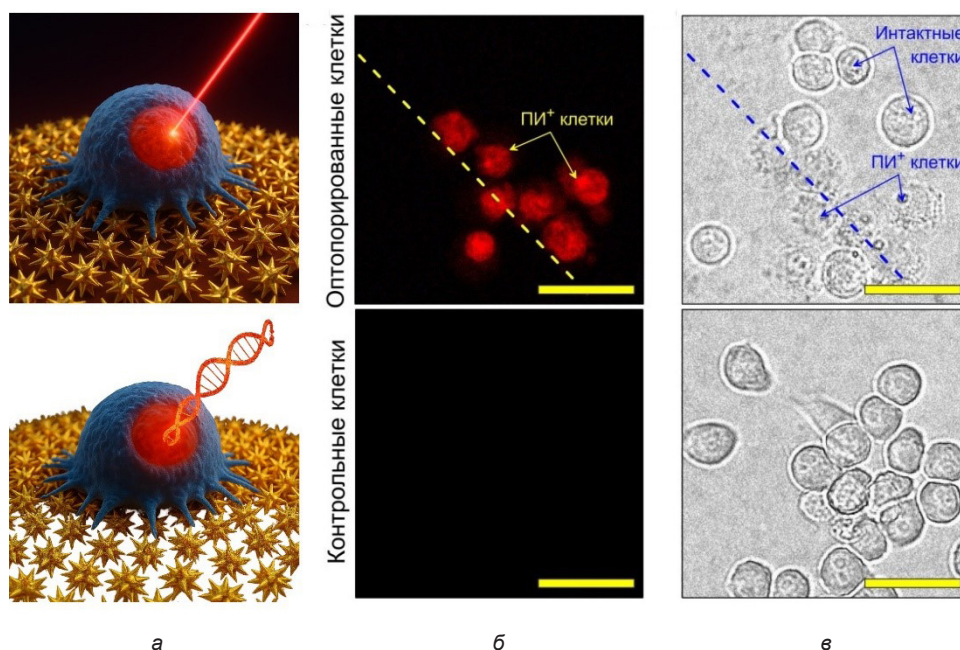
Ключевым этапом при создании ИБМКП на основе CAR-T-клеток является генетическая модификация (именуемая также трансфекцией) Т-лимфоцитов, эффективность которой напрямую зависит от поддержания жизнеспособности функционально активных модифицированных клеток. Известные способы внутриклеточной доставки генетических конструкций включают вирусные и невирусные методы с использованием различных химических агентов и/или

физических воздействий. Существующие вирусные векторы, несмотря на их широкое применение, несут потенциальные риски цитотоксичности, иммуногенности и возврата к патогенности исходного вируса [2]. Кроме того, существует вероятность проявления генотоксических эффектов, обусловленных спонтанным инсерционным мутагенезом в участки генома, ассоциированных с онкогенезом [3]. Напротив, невирусные системы представляют значительный интерес для генетической модификации Т-клеток.

Несмотря на бурное развитие в течение последнего десятилетия технологий на основе разнообразных химических агентов [4] и наноматериалов [5], сохраняются существенные ограничения для внедрения их в производственную практику, включая недостаточную эффективность, сниженную жизнеспособность клеток, проблемы масштабируемости и несовместимость с различными типами клеток и доставляемых агентов. Альтернативную стратегию представляют физические методы доставки [6], основанные на модуляции проницаемости клеточных мембран. Однако такие широко распространенные в лабораторной практике подходы, как микроинъекция, электро- и сонопорация, часто сопряжены с неприемлемым уровнем клеточного стресса, что проявляется в снижении пролиферативного потенциала и функциональной активности модифицированных клеток.

В настоящей работе рассмотрены возможности генетической модификации Т-клеток путем доставки целевых векторов с использованием разработанной нами ранее технологии лазерной трансфекции (здесь и далее – система оптотрансфекции) [7]. Принцип действия системы заключается в направленном лазерном воздействии, сфокусированном на культуральной поверхности с покрытием наночастицами золота (ЗНЧ), непосредственно контактирующими с поверхностью клеток (рисунок, а). В результате этого индуцируется повышение проницаемости

Ответственный автор – Тимофей Евгеньевич Пылаев  
Corresponding author – Timofey E. Pylaev  
E-mail: [pylaevte@gmail.com](mailto:pylaevte@gmail.com)



Принцип действия технологии опотрансфекции клеток на платформах ЗНЧ-опто\_24 с применением сфокусированного ИК-лазерного облучения (а). Результаты опторации клеток RAW 264.7: (б) флуоресцентные и (в) фазово-контрастные микрофотографии клеток; желтой и синей пунктирными линиями показана траектория движения лазерного луча; масштабные линии соответствуют 50 мкм

цитоплазматических мембран для доставляемых векторов, находящихся в растворе питательной среды [8].

Отличительными преимуществами нашей системы, подтвержденными на уровне расширенных лабораторных испытаний на соответствующем общемировом стандартом уровне [9], являются следующие возможности:

тонкой настройки режимов за счет регулировки параметров лазерного облучения и слоев ЗНЧ, вплоть до проведения трансфекции на уровне единичных клеток;

масштабирования и автоматизации технологического процесса полного цикла от изготовления платформ до осуществления самой процедуры опторации в условиях научно-медицинского центра.

**Цель** работы состоит в адаптации технологии репрограммирования генома на основе лазерной трансфекции для создания биомедицинских клеточных продуктов. В частности, будут оптимизированы параметры лазерного воздействия и оценены показатели эффективности опотрансфекции и выживаемости клеток линии мышиных макрофагов RAW 264.7, являющихся одной из общепринятых релевантных моделей человеческого Т-клеток. Данное исследование является неотъемлемым шагом перед переходом к работе на реальных донорских образцах и позволит провести объективную оценку применимости нашей системы опотрансфекции для создания целевых иБМКП на основе CAR-T-клеток.

**Материал и методы.** Для проведения серии экспериментов по опотрансфекции *in vitro* использованы разработанные нами ранее специализированные платформы, представляющие собой многолуночные культуральные планшеты с покрытием рабочей поверхности (дно лунок) монослоем ЗНЧ. Платформы представляли собой стандартные 24-луночные полистироловые планшеты с покрытием дна лунок слоями ЗНЧ звездообразной геометрии с поверхностной плотностью упаковки в пересчете на металлическое

золото 15 мкг/см<sup>2</sup> (здесь и далее используется сокращенный код платформы ЗНЧ-опто\_24). Изготовление платформ ЗНЧ-опто\_24 осуществлялось по нашей методике седиментационного асемблирования химически синтезированных ЗНЧ на активированных поверхностях культурального пластика [10].

В работе использованы макрофагально-моноцитарные клетки мыши линии RAW 264.7, полученные из Российской коллекции клеточных культур (ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург). Поддержание и культивирование клеток осуществляли монослойно в культуральных флаконах на полной питательной среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (Himedia, Индия), содержащей 10%-ю фетальную бычью сыворотку и 100 мкг/мл смеси антибиотиков (пенициллин – стрептомицин – неомицин), в клеточном инкубаторе Innova (New Brunswick Scientific, Германия) при 37°C во влажной атмосфере со средним содержанием CO<sub>2</sub> на уровне 5%. Замену питательной среды производили каждые 3–5 дней, клетки пассировали при достижении 80–90% конфлюэнтности монослоя путем стандартной процедуры трипсинизации. В экспериментах по опотрансфекции участвовали клетки на 2–10-м пассажах. Клетки пересаживали в лунки платформ ЗНЧ-опто\_24 путем переноса клеточной суспензии с посевной дозой 8×10<sup>4</sup> шт./мл с последующим культивированием в течение 24 ч. Расчет посевной дозы осуществлялся на автоматическом счетчике клеток TC20 (BioRad, США). Опотрансфекцию проводили путем однократного лазерного облучения 1064-нанометровым импульсным лазером с узкофокусированным (10 мкм в перетяжке) пучком на дне лунок планшета в режиме 2D-сканирования всей рабочей поверхности. Лазерное облучение проводили с использованием установки LSF-20M (HGTEch, Китай). После завершения облучения производили замену питательной среды на среду, содержащую доставляемые агенты. В качестве модельного агента для доставки использован молекулярный флуоресцентный

краситель пропидиум иодид – ПИ (Sigma, США) с финальной концентрацией раствора 10 мкМ. Эффективность оптотрансфекции оценивали спустя 6 ч после облучения методом прижизненной микроскопической визуализации путем прямого подсчета относительного числа светящихся клеток на платформах ЗНЧ-опто\_24. Анализ проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа NIB620FL (Nexcore, Китай). Оценочный мониторинг состояния клеточного монослоя осуществляли методом фазово-контрастной микроскопии. Количественный анализ жизнеспособности произведен с применением общепринятого метаболического резазурин-теста на основе красителя Alamar Blue [11]. Процедура оптотрансфекции проведена путем трех независимых полных воспроизведений описанных шагов на трех идентичных платформах ЗНЧ-опто\_24, количество тестовых и контрольных лунок – по 10 шт. в каждом. В качестве контроля выступали монослои интактных клеток, культивированные в лунках стандартных 24-луночных планшетов. Таким образом, суммарное количество образцов составило 120 с плотностью анализируемых популяций – не менее чем  $10^4$  шт. на лунку.

Статистическая обработка полученных данных проведена при помощи стандартных пакетов Microsoft Excel 2010. Полученные данные представлены в виде нормированных на общее число клеток в монослое средних значений долей и их ошибок по результатам трех независимых экспериментов ( $M \pm SD$ ). Для статического сравнения данных между опытной и контрольной группами использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента. При  $p \leq 0,05$  различия между группами считали достоверными.

**Результаты.** Первая часть исследований заключалась в определении диапазона рабочих режимов и параметров клеточной плотности для проведения оптотрансфекции. Для этого монослои клеток RAW 264.7, выращенные на платформах ЗНЧ-опто\_24, подвергались однократному лазерному облучению при градиентных значениях одного из параметров и неизменных значениях прочих. Затем интегрально оценивали эффективность (относительное количество ПИ<sup>+</sup>-клеток) и жизнеспособность клеток (визуальная оценка и резазурин-тест) через 30 мин и 24 ч после облучения соответственно. В результате определен верхний порог интенсивности облучения  $3 \pm 0,5$  мкДж по наличию существенного угнетения жизнеспособности клеток. Нижний порог интенсивности зарегистрирован на уровне  $1,2 \pm 0,2$  мкДж по отсутствию статистически значимого увеличения числа ПИ<sup>+</sup>-клеток после облучения. При этом жизнеспособность клеток на всем диапазоне режимов сохранялась на уровне 85–90% ( $n=50$ ;  $p < 0,05$ ). Максимальное количество ПИ<sup>+</sup>-клеток зафиксировано при лазерном воздействии с энергией импульса 1,4 мкДж. Параллельно был найден нижний порог стартовой конfluenceности клеточного монослоя, составляющий 40% от полного заполнения площади дна культуральных лунок. Посев клеток с последующей оптотрансфекцией при меньшей плотности приводил к замедлению пролиферативной активности и существенной гибели клеток после лазерного воздействия.

Последующая часть работы заключалась в проведении оценочной серии экспериментов при фиксированных режимах лазерного воздействия (1,4 мкДж, скважность – 200 нс, частота – 10 кГц, скорость 2D-сканирования – 0,25 м/с). Статистический анализ учета параметров эффективности оптотрансфекции

клеток RAW 264.7 спустя 6 ч после облучения и анализ жизнеспособности через 24 ч после оптотрансфекции показали значения  $78 \pm 7,6$  и  $84 \pm 9,3\%$  ( $n=120$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно. Микрофотографии модифицированных клеток, полученные через 2 ч после лазерного облучения, приведены на рисунке, б и в. Спустя 24 ч естественного самовосстановления клеток характерные визуальные изменения морфологии клеточной поверхности, регистрируемые в первые 5 ч после лазерного излучения, нивелируются, при этом состояние монослоев становится идентичным с контрольными образцами. Дальнейшее культивирование модифицированных клеток в течение 21 дня, поддержание в течение повторяющихся циклов крио-/деконсервации в условиях жидкого азота происходят в пределах нормальных физиологических показателей.

**Обсуждение.** Известной морфофункциональной особенностью клеток RAW 264.7, как и человеческих лимфоцитов, является невозможность культивирования в высокоплотных культурах: по достижению 70–80% конfluenceности монослоя они теряют адгезионную способность, открепляются от субстрата и погибают [12]. Для повышения шансов и увеличения временного окна на успешное проведение необходимых манипуляций единственным выходом является снижение стартовой конfluenceности монослоя клеток как минимум до 30% на начало трансфекции для того, чтобы было достаточно времени (не менее 72 ч) для самовосстановления клеток, переходе к активной пролиферации и началу экспрессии целевого вектора.

Следует отметить, что использование нашей системы позволяет трансфицировать «трудно трансфицируемые клетки», в том числе лимфоцитарные клетки, при минимальной конfluenceности монослоя, в то время как коммерческие агенты [13] предназначены только для 70%-й конfluenceности. Применение импульсного наносекундного лазера с широким диапазоном настройки параметров облучения позволяет минимизировать риски при трансфекции клеток и существенно повышает эффективность доставки целевых агентов при незначительном влиянии на жизнеспособность клеток за счет высокой частоты следования коротких импульсов. Комбинация адаптивного лазерного источника с минимальным числом шагов манипуляций от культивирования клеток до трансфекции на единой высокосовместимой платформе ЗНЧ-опто\_24 на «привычном» для клеток формате культурального пластика позволяет значительно повысить общую производительность системы оптотрансфекции.

Еще одно важное преимущество нашей системы оптотрансфекции – возможность тонкой настройки параметров облучения импульсного лазера под индивидуальные особенности объектов. Напротив, характерное для электропорации неравномерное распределение поля и невозможность тонкой его настройки и, как следствие, неконтролируемое образование пор в цитоплазматической мембране клеток не позволяют стандартизовать технологию и добиться высокой степени модификации [14]. Так, в недавней работе N. Alawar и соавт. [15] были предложены специализированные условия для проведения электропорации, тем не менее достигнутые значения выживаемости Т-клеток и степень модификации не превышали 30 и 20% соответственно.

**Заключение.** Показаны адаптивные возможности системы оптотрансфекции для контролируемой

высокоэффективной лазерной трансфекции клеток линии мышиных макрофагов RAW 264.7, являющихся одной из общепринятых релевантных моделей человеческих Т-клеток. Достигнутые показатели эффективности создают необходимый фундаментальный базис для трансфера разрабатываемой технологии оптотрансфекции и являются отправной точкой для дальнейшей работы по созданию иБМКП на основе *ex vivo*-генетической модификации Т-клеток. Возможность тонкой регулировки параметров лазерного воздействия обеспечивает повышенную воспроизводимость результатов генетической модификации и открывает перспективы для создания замкнутых автоматизированных систем производства иБМКП.

Предлагаемая система оптотрансфекции может рассматриваться как принципиально новая конкурентная технологическая платформа, которая будет способствовать продвижению CAR-T и смежных с ней вариантов генно-клеточных персонализированных терапевтических подходов как видов высокотехнологичной медицинской помощи, крайне востребованной и приоритетной в Российской Федерации и во всем мире.

**Источники финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России «Разработка системы доставки терапевтических нуклеиновых кислот и биомедицинских клеточных продуктов для целей CAR-T-терапии онкогематологических заболеваний на основе инновационной технологии лазерной трансфекции» (регистрационный номер 25030703343-1).

#### References (Список источников)

1. Sun D. CAR-T cell therapy: A breakthrough in traditional cancer treatment strategies (Review). *Mol Med Rep.* 2024;29(3):47. DOI:10.3892/mmr.2024.13171
2. Joy R, Phair K, O'Hara R, Brady D. Recent advances and current challenges in CAR-T cell therapy. *Biotechnol Lett.* 2024;46:115-26. DOI:10.1007/s10529-023-03461-0

3. Misra S. Human gene therapy: A brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India.* 2013;61:127-33. PMID:24471251
4. Chali SP, Ravoo BJ. Polymer nanocontainers for intracellular delivery. *Angew Chem Int Ed.* 2020;59:2962-72. DOI:10.1002/anie.201907484
5. Jat SK, Bhattacharya J, Sharma MK. Nanomaterial based gene delivery: A promising method for plant genome engineering. *J Mater Chem B.* 2020;8:4165-75. DOI:10.1039/D0TB00217H
6. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: A technical review. *Peer J.* 2021;9:e11165. DOI:10.7717/peerj.11165
7. Pylaev T. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers. *J Biophotonics.* 2019;12(1):e201800166. DOI:10.1002/jbio.201800166
8. Pylaev T, Efremov Yu, Avdeeva E, et al. Optoporation and recovery of living cells under au nanoparticle layer-mediated NIR-laser irradiation. *ACS Applied Nano Materials.* 2021;4(12):13206-17. DOI:10.1021/acsnm.1c02734
9. Pylaev T, Avdeeva E, Khlebtsov B, et al. High-throughput cell optoporation system based on Au nanoparticle layers mediated by resonant irradiation for precise and controllable gene delivery. *Scientific Reports.* 2024;14:3044. DOI:10.1038/s41598-024-53126-9
10. Pylaev T, Avdeeva E, Khlebtsov B, et al. A novel centrifuge-based approach for tunable 2D layering of plasmonic nanoparticles. *Proc. SPIE 2018. Saratov Fall Meeting 2018: Optical Technologies in Biophysics & Medicine XIX;*11067:1106711. DOI:10.1117/12.2522135
11. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012;12:12347-60. DOI:10.3390/s120912347
12. Taciak B, Białasek M, Braniewska A, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS One.* 2018;13(6):e0198943. DOI:10.1371/journal.pone.0198943
13. Lipofectamine® 2000 Reagent. URL: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine\\_2000\\_Reag\\_protocol.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf) (17 Nov 2025).
14. Pan J, Chiang C-I, Wang X, et al. Cell membrane damage and cargo delivery in nano-electroporation. *Nanoscale.* 2023;15(8):4080-9. DOI:10.1039/D2NR05575A
15. Alawar N, Schirra C, Hohhman M, Becherer U. A solution for highly efficient electroporation of primary cytotoxic T lymphocytes. *BMC Biotechnol.* 2024;24(1):16. DOI:10.1186/s12896-024-00839-4

Статья поступила в редакцию 17.10.2025; одобрена после рецензирования 20.11.2025; принята к публикации 22.11.2025. The article was submitted 17.10.2025; approved after reviewing 20.11.2025; accepted for publication 22.11.2025.

#### Информация об авторе:

**Тимофей Евгеньевич Пылаев** – директор научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, кандидат биологических наук, [pylaevte@gmail.com](mailto:pylaevte@gmail.com), ORCID 0000-0002-2701-3333.

#### Information about the author:

**Timofey E. Pylaev** – Director of the Research, Production and Educational Center for Molecular Genetic and Cellular Technologies, PhD, [pylaevte@gmail.com](mailto:pylaevte@gmail.com), ORCID 0000-0002-2701-3333.