

УДК 620.3

# Синтез и характеристика гибридных наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ для биомедицинских применений

И. В. Зелепукин<sup>1,2,3\*</sup>, В. О. Шипунова<sup>1,2,3</sup>, А. Б. Миркасымов<sup>1,2</sup>, П. И. Никитин<sup>3,4</sup>,  
М. П. Никитин<sup>1,2</sup>, С. М. Деев<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

<sup>3</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское ш., 31

<sup>4</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

<sup>5</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

\*E-mail: zelepukin@phystech.edu

Поступила в редакцию 15.07.2017

Принята к печати 30.10.2017

**РЕФЕРАТ** Создание маркеров, позволяющих получать одновременно количественную и визуальную информацию для картирования тканевых макрофагов и других клеток, представляет существенный интерес. Нами синтезированы магнитные и магнитно-флуоресцентные наномаркеры для мечения клеток, с высокой чувствительностью регистрируемые методом MPQ-детекции. Для стабилизации в физиологических условиях маркеры были покрыты оксидом кремния, причем с использованием модифицированной реакции Штобера получены маркеры, различающиеся размером и зарядами кинетического слоя. Разработан простой двухстадийный метод синтеза, позволяющий получать покрытые кремнием магнитные частицы с карбоксигруппами на поверхности сразу после завершения реакции Штобера за счет предварительной стабилизации маркеров карбоксиполимером. Полученные наномаркеры охарактеризованы методами электронной микродифракции, просвечивающей электронной микроскопии, динамического и электрофлоретического светорассеяния, изучено их взаимодействие с линиями эукариотических клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** магнитная детекция, магнитные наночастицы, мечение клеток, модификация поверхности, оксид кремния.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** MPI (magnetic particle imaging) – метод визуализации магнитных частиц; MPQ (magnetic particle quantification) – метод количественной детекции магнитных частиц; ТЕОС – тетраэтилортосиликат; m-cit – магнитные частицы, покрытые цитрат-анионом; m-CMD – магнитные частицы, покрытые карбоксиметилдекстраном; m-cit-SiO<sub>2</sub> – магнитные частицы, покрытые оксидом кремния через промежуточное покрытие цитрат-анионом; m-CMD-SiO<sub>2</sub> – магнитные частицы, покрытые оксидом кремния через промежуточное покрытие карбоксиметилдекстраном.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время растет интерес к использованию наночастиц в качестве тераностических объектов (агентов, объединяющих диагностические и терапевтические функции на одной платформе) [1–3], создаются наноконструкции, способные выполнять терапевтическую функцию или связываться с клетками только в ответ на определенные сигналы от организма или на отсутствие таких сигналов [4], или внешних стимулов [5]. Для ранней диагности-

ки заболеваний и мониторинга проводимой терапии важна визуализация распределения наноагентов в организме при помощи различных маркеров.

Многие магнитные наночастицы относятся к суперпарамагнитным частицам, что позволяет детектировать их методами магнитно-резонансной томографии [6], MPI-визуализации [7], ферромагнитного резонанса [8], гигантского магнитного сопротивления [9] и другими [10–12]. Особый интерес представляет метод детекции нелинейных магнитных материалов,

основанный на воздействии на образец магнитным полем, генерируемым на двух частотах, и получения отклика на комбинаторных частотах приложенного поля (MPQ-детекция) [13]. Этот метод позволяет высокочувствительно и количественно выявлять суперпарамагнитные наночастицы в широком диапазоне концентраций, а также неинвазивно в живом организме, что открывает широкие перспективы для их использования в биомедицине.

Нестабилизированные магнитные наночастицы не обладают коллоидной стабильностью в физиологических условиях, они подвержены окислению, что может ухудшить предел их детекции [14]. Эффективным плотным покрытием, которое может защитить магнитные частицы от окисления и агрегации, является оболочка из диоксида кремния. Такое покрытие высокостабильно, инертно, его поверхность можно модифицировать для получения необходимых функциональных групп. Кроме того, мезопористую структуру оксида кремния используют для доставки терапевтических агентов и генетических векторов [15].

Наночастицы, содержащие диоксид кремния, часто синтезируют с помощью метода Штобера. Это простой и удобный одноступенчатый метод, в котором не используются сурфактанты или токсичные органические растворители, а относительно низкая скорость образования неорганических слоев позволяет контролировать размер получающихся наночастиц [16].

Нами синтезированы магнитные и магнитно-флуоресцентные маркеры, покрытые оболочкой оксида кремния. Поверхность частиц была функционализирована амино- и карбоксигруппами, чтобы обеспечить использование данных маркеров для конъюгации с другими наноагентами, белками и направляющими соединениями. Предложен также метод покрытия магнитных частиц оксидом кремния без необходимости дальнейшей модификации поверхности функциональными группами. Синтезированные нами наночастицы изучены методами просвечивающей электронной микроскопии, микродифракции электронов, динамического и электрофоретического светорассеяния, измерена чувствительность наночастиц в качестве магнитных маркеров для биомедицинских исследований. Показана возможность как количественного, так и визуального эффективного мечения наночастицами эукариотических клеток различного происхождения, установлена также относительно низкая цитотоксичность полученных маркеров в тестируемых концентрациях.

Полученные маркеры могут быть использованы *in vivo*, например, для выявления тканевых макро-

фагов и определения их активности для диагностики атеросклероза, рака, инфаркта миокарда и других заболеваний человека [17, 18].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы хлоридтетрагидрат железа (II), хлоридгексагидрат железа (III), тетраэтилорто-силикат (ТЕОС), (3-аминопропил)триэтоксисилан, трис(2,2'-бипиридил)рутения (II) хлорид гексагидрат, янтарный ангидрид, карбоксиметилдекстрана на натрия соль, L-глутамин, краситель Hoechst 33342 фирмы Sigma-Aldrich, аммиак водный («ос. ч.»), азотная кислота («ос. ч.»), натрий лимонно-кислый трехзамещенный дигидрат, изопропиловый спирт («х. ч.»), этиловый спирт («х. ч.»), диметилсульфоксид («х. ч.») фирмы «Химмед», нингидрин («х. ч.»), раствор МТТ фирмы «Диаэм», метиловый спирт сухой фирмы Merck, конканавалин А (лектин из *Canavalia ensiformis*) фирмы Vector Laboratories, фосфатно-солевой буфер (PBS) pH 7.4, карбонатный буфер pH 9, среда McCoy's 5A фирмы Life technologies, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (FBS) фирмы HyClone, клетки линий BT-474, SK-BR-3 (молочная железа человека), HEK 293T (почка эмбриона человека), CHO (яичник китайского хомячка). Для магнитной сепарации использовали постоянный цилиндрический железо-бор-неодимовый магнит D 25 × 10 мм фирмы Ningbo Ketian Magnet Co.

### Синтез наночастиц магнетита

В смесь, содержащую 2.9 ммоль  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10.1 ммоль  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и 40 мл дистиллированной воды, добавляли 5 мл 30%  $\text{NH}_4\text{OH}$  при постоянном перемешивании. Затем выдерживали раствор при 80°C в течение 2 ч. Полученные частицы обрабатывали раствором 2 М  $\text{HNO}_3$ , а затем многократно промывали дистиллированной водой путем магнитной сепарации на 25-мм железо-бор-неодимовом магните. Последовательно собирали частицы, не притянувшиеся к магниту за 15 мин, получая таким образом различные фракции магнитных частиц. Первые две фракции имели низкие значения pH, что приводило к быстрой деградации частиц. В экспериментах использовали магнитные наночастицы третьей фракции.

### Покрытие наночастиц оксидом кремния

Для стабилизации магнитных наночастиц в условиях реакции частицы предварительно покрывали цитрат-анионом, добавляя в коллоидный раствор магнитных частиц трехзамещенный цитрат натрия до концентрации 25 г/л. Альтернативно частицы могли быть покрыты полимерным покрытием из карбоксиметилдекстрана. Для этого в коллоидный раствор наночастиц при нагревании до 80°C до-

бавляли карбоксиметилдекстран до концентрации 50 г/л. После предварительной стабилизации магнитные частицы трехкратно промывали дистиллированной водой.

Магнитные частицы в объеме 50 мкл вносили в 1 мл спирта, рН реакционной смеси доводили до 9 и добавляли от 10 до 200 мкл ТЕОС. Через 1 день наночастицы промывали дистиллированной водой методом центрифугирования.

#### **Функционализация поверхности кремниевых наночастиц**

К синтезированным частицам добавляли 1% раствор (3-аминопропил)триэтоксисилана в этаноле, что приводило к экспонированию первичных аминогрупп на их поверхности. Затем частицы двукратно промывали этанолом. Далее аминогруппы модифицировали в карбоксигруппы, добавляя янтарный ангидрид в карбонатном буфере (рН 9) до концентрации 4 г/л. Через 3 ч частицы отмывали от продуктов реакции дистиллированной водой.

#### **Получение магнитно-люминесцентных кремниевых наночастиц**

Магнитно-люминесцентные наночастицы получали аналогично магнитным частицам, покрытым оксидом кремния в этаноле, добавляя 0.03 мг трис(2,2'-бипиридил)рутения (II) хлорида гексагидрата на 1 мл реакционной смеси через 5 мин после начала реакции гидролиза ТЕОС. После синтеза наночастицы хранили в темноте при +4°C.

#### **Характеристика частиц**

Гидродинамический размер наночастиц и потенциал кинетического слоя определяли методами динамического светорассеяния и электрофоретического светорассеяния с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Использовали параметр среднего размера частиц и среднее значение дзета-потенциала. Для измерения потенциала кинетического слоя частицы перед измерением переводили в PBS, рН 7.4.

Морфологию наночастиц исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL Ltd.) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Образцы наночастиц наносили на медную сетку с углеродным покрытием, а затем высушивали на воздухе.

Фазовый состав частиц определяли методом микродифракции электронов.

Магнитный сигнал маркеров определяли методом МРQ-детекции нелинейных магнетиков [13]. Для измерения в катушку помещали 20 мкл образца наночастиц.

Спектр флуоресценции и поглощения получен с использованием планшетного ридера Infinite M1000PRO (Tecan Group Ltd.).

#### **Мечение клеток наночастицами**

Клетки линий BT-474, SK-BR-3, НЕК 293Т, СНО культивировали в среде McCoу's 5А с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и 2 мМ L-глутамин при +37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пересеивали 2–3 раза в неделю при достижении 80–90% монослоя. Клетки, снятые с поверхности культурального пластика (0.7 × 10<sup>6</sup>), промывали дважды PBS, инкубировали с наночастицами в концентрации 0.01 г/л в течение 2 ч при комнатной температуре, отмывали при постоянном перемешивании от несвязанных частиц. Количество частиц, связанных с клетками, определяли методом МРQ-цитометрии [18].

#### **Анализ жизнеспособности клеток**

Цитотоксичность наночастиц оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки рассеивали на 96-луночный планшет по 10<sup>4</sup> клеток на лунку в 200 мкл среды McCoу's 5А с 10% FBS. Клетки культивировали при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение ночи, затем среду удаляли и к клеткам стерильно добавляли бессывороточную среду (отрицательный контроль) и бессывороточную среду, содержащую тестируемые частицы в различных концентрациях в объеме 100 мкл на лунку. Клетки инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре, затем промывали бессывороточной средой, добавляли McCoу's 5А с 10% FBS и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (24 ч, 37°C). Затем среду стряхивали, клетки промывали 1 раз средой. После этого в лунки вносили по 100 мкл раствора МТТ (0.5 г/л в McCoу's 5А), инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. По истечении этого времени раствор МТТ удаляли, к содержимому лунок добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида, планшет встряхивали до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность содержимого каждой лунки измеряли на планшетном анализаторе Infinite M1000PRO (Tecan Group Ltd.) на длине волны λ = 540 нм.

#### **Флуоресцентная микроскопия**

Клетки рассеивали на 96-луночный планшет по 10<sup>4</sup> клеток на лунку в 200 мкл среды McCoу's 5А с 10% FBS. После культивирования при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение ночи к клеткам стерильно добавляли тестируемые частицы, инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем промывали бессывороточной средой, добавляли McCoу's 5А с 10%

FBS и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего трижды промывали PBS. Образцы клеток анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000B (Leica Microsystems) в проходящем свете и в каналах флуоресценции, соответствующих флуоресценции наночастиц (возбуждение 545/30, эмиссия 610/75) и флуоресценции красителя Hoechst 33342 (возбуждение 360/40, эмиссия 470/40).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наночастицы магнетита синтезировали методом копреципитации хлоридов железа (II) и (III) в щелочных условиях. Синтез был оптимизирован для получения магнитных маркеров с минимальным пределом детекции. Так как многие фазы оксигидроксидов железа, получающиеся в результате реакции, не являются суперпарамагнитными и уменьшают удельный детектируемый магнитный сигнал всего образца наночастиц [19], очень важно было установить оптимальное соотношение солей железа в реакционной смеси. Установлено, что максимальный удельный сигнал частицы имеют при соотношении солей в смеси  $[\text{FeCl}_2]/[\text{FeCl}_3] = 1/3.5$ . Максимум магнитного сигнала при этом наблюдается в третьей и четвертой фракциях наночастиц (рис. 1А). Предел детекции таких наночастиц, определенный методом МРQ, составил 2.7 нг в 20 мкл раствора.

Далее наночастицы покрывали оксидом кремния. Дзета-потенциал магнитных наночастиц при pH 9 близок к нулю, что приводит к их агрегации в условиях реакции. Агломераты, образовавшиеся при высоких значениях pH, не выходят из осадка и теряют коллоидную стабильность, поэтому необходимо было модифицировать частицы перед синтезом кремниевого покрытия. С этой целью, как и в [20], использовали цитратное покрытие (далее такие частицы обозначены как m-cit). При этом потенциал кинетического слоя наночастиц становился сильно отрицательным, и частицы оставались стабильными в широком диапазоне значений pH. В качестве альтернативного типа промежуточного покрытия впервые использовано полимерное карбоксиметилдекстрановое покрытие (далее m-CMD). Магнитные наночастицы, покрытые карбоксиметилдекстраном, были стабильными в условиях реакции. Кроме того, полимер связывал между собой несколько частиц магнетита, что позволяло получать покрытые полимером частицы с высоким содержанием магнитных ядер, а следовательно, с более низким пределом детекции. Затем проводили гидролиз тетраэтилортосиликата и поликонденсацию продуктов реакции на поверхности магнетита.

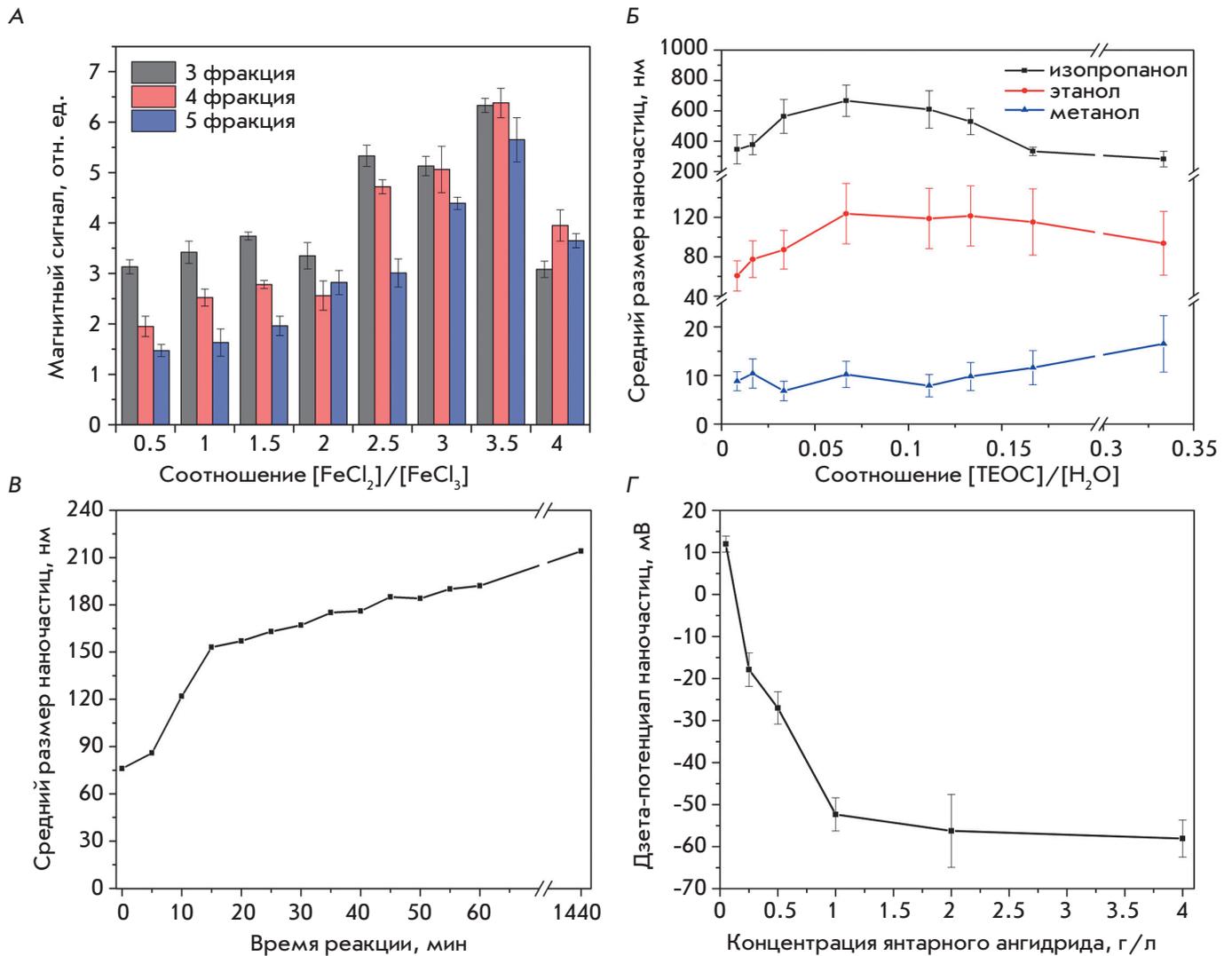
В качестве модельной системы для изучения основных зависимостей синтеза использовали синтез наночастиц оксида кремния без магнитного ядра. Изучено влияние таких параметров, как используемый растворитель, соотношение  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]$  и pH реакции, на размер получаемых SiO<sub>2</sub>-наночастиц.

Установлено, что увеличение длины углеродной цепочки в используемом спирте приводит к существенному увеличению размера синтезируемых частиц. Средний размер частиц оксида кремния в метаноле составлял ~10 нм, в этаноле – 100 нм, изопропанол – 500 нм. Растворители с более длинной углеродной цепочкой являются гидрофобными, что не позволяет провести стандартную реакцию Штобера. Изменение соотношения  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]$  в реакции позволяло более точно контролировать размеры получаемых частиц оксида кремния (рис. 1Б). Зависимость гидродинамического размера частиц от соотношения реагентов имела характерный вид с выраженным максимумом, что, вероятно, связано с истощением тетраэтилортосиликата или воды в результате реакции на краях исследуемого диапазона концентраций. Реакция Штобера протекает при щелочных значениях pH, при этом увеличение pH приводило к многократному ускорению реакции, что негативно сказывалось на дисперсности размеров частиц. Большинство экспериментов было проведено при pH 9, при этом время синтеза частиц составляло примерно 1 ч (рис. 1В).

Нами синтезированы как магнитные, так и магнитно-люминесцентные наночастицы, покрытые оксидом кремния. Рост размера магнитно-кремниевых частиц зависел от условий реакции так же, как и кремниевых частиц. В частности, соотношение  $[\text{TEOS}]/[\text{H}_2\text{O}]$  при синтезе m-cit-SiO<sub>2</sub> влияло на размер наночастиц так же, как ранее было определено для SiO<sub>2</sub>-наночастиц.

Использование метанола в качестве растворителя позволяло получить магнитные частицы со средним размером в диапазоне 50–80 нм, этанола – от 100 до 200 нм. В изопропанол магнитные частицы, покрытые цитратом, агрегировали, поэтому для проведения реакции их сначала покрывали тонким слоем SiO<sub>2</sub> в метаноле, а потом использовали в качестве ядер нуклеации в новой реакции Штобера в изопропанол. Это позволило получить частицы размером 300–500 нм.

При использовании карбоксиметилдекстрана в качестве промежуточного покрытия мы получали наночастицы со средним размером  $200 \pm 60$  нм, при этом средний размер первоначальных m-CMD-частиц составлял  $44 \pm 12$  нм. Наночастицы размером  $200 \pm 60$  нм двукратно использовали как «затравки» в реакции Штобера в изопропанол для получения



**Рис. 1.** Контроль физико-химических свойств магнитно-кремниевых наночастиц. **А** – зависимость удельного магнитного сигнала наночастиц от соотношения солей железа. **Б** – зависимость гидродинамического размера частиц от соотношения реагентов  $[\text{TEOS}]/[\text{H}_2\text{O}]$  в реакции для различных растворителей. **В** – рост гидродинамического размера частиц в ходе реакции Штобера от времени. **Г** – влияние количества янтарного ангидрида в реакционной смеси на потенциал кинетического слоя наночастиц. Планки погрешностей характеризуют стандартное отклонение от среднего значения размера частиц

частиц размером  $764 \pm 187$  нм. Использование описанных частиц в качестве ядер нуклеации в многоступенчатом варианте метода Штобера позволяет получить частицы более крупного размера, малоперспективные для *in vivo* экспериментов [21], однако интересные для *ex vivo* и *in vitro* диагностики.

Для синтеза флуоресцентных наночастиц мы, как и в [22], добавляли  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$  в реакционную смесь через 5 мин после начала реакции, чтобы избежать агрегации магнитных ядер за счет увеличения ионной силы раствора. Трис(2,2'-бипиридил)-

рутения (II) встраивался в образуемую аморфную решетку оксида кремния, в силу чего частицы приобрели флуоресцентные свойства. Спектр поглощения и флуоресценции частиц представлен на рис. 2. Частицы сохраняли коллоидную стабильность и способность к флуоресценции в течение, как минимум, 1 года.

Для различных биоприменений наночастиц часто требуется их конъюгация с белками или другими объектами. Конъюгация позволяет связывать между собой самые разные функциональные группы, одна-

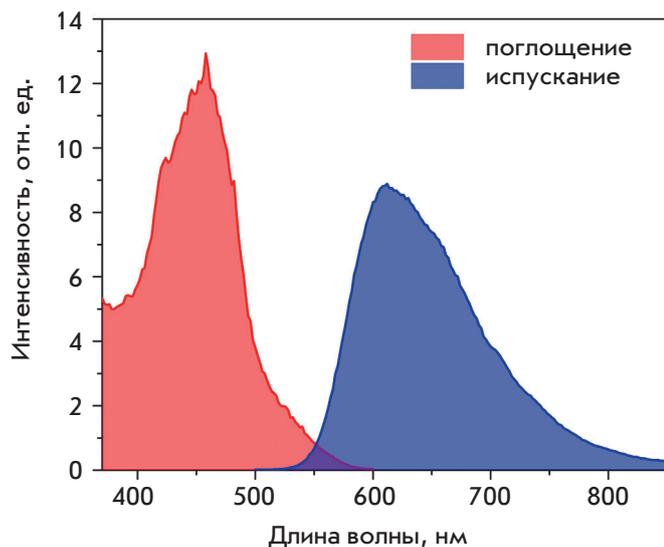


Рис. 2. Спектр поглощения и флуоресценции магнитно-люминесцентных кремниевых наночастиц

ко одним из наиболее удобных способов считается конъюгация карбоксильной группы с аминогруппой карбодимидным методом с образованием стабильной пептидной связи [23]. Синтезируемые наночастицы  $m\text{-cit-SiO}_2$  первоначально содержат на поверхности гидроксильные группы, поэтому мы проводили двухступенчатую модификацию их поверхности, чтобы получить карбоксильные группы. Сначала поверхность  $\text{SiO}_2$ -частиц обрабатывают (3-аминопропил)триэтоксисиланом. Присутствие аминогрупп на поверхности доказано изменением окраски раствора наночастиц при их взаимодействии с 5% раствором нингидрина, а также изменением среднего дзета-потенциала частиц с  $-36$  до  $+12$  мВ. После этого частицы обрабатывали янтарным ангидридом, и в результате реакции дециклизации аминогруппы на поверхности превращались в карбоксильные группы. Логарифмическая зависимость величины получаемого дзета-потенциала частиц от концентрации янтарного ангидрида в смеси позволила нам получить набор частиц с разными потенциалами кинетического слоя в диапазоне  $+12 \dots -58$  мВ (рис. 1Г).

Экспонирование аминогрупп на поверхности приводит к агрегации частиц, однако после второго этапа модификации гидродинамический размер частиц становится равным размеру первоначальных частиц, что подтверждает отсутствие образования агрегатов и позволяет использовать метод для получения коллоидно-стабильных растворов магнитно-кремниевых частиц с разными зарядами.

Стоит отметить, что при использовании карбоксиметилдекстрана для промежуточной стабилизации

магнетита нет необходимости в дополнительной модификации поверхности магнитно-кремниевой частицы, так как сразу после синтеза на поверхности находятся карбоксигруппы в составе углеводного полимера. Присутствие декстрана на поверхности подтверждено седиментацией частиц в присутствии конканавалина А, связывающего сахара, а следовательно, и частицы с полисахаридом на поверхности между собой [24]. Таким образом, использование карбоксиметилдекстрана позволяет ускорить синтез и сразу после реакции Штобера получить маркеры, готовые к конъюгации с белками.

Морфологию синтезированных в этаноле и метаноле магнитно-кремниевых наночастиц  $m\text{-cit-SiO}_2$  с карбоксигруппами на поверхности и частиц  $m\text{-CMD-SiO}_2$ , синтезированных в метаноле, изучали методами просвечивающей электронной микроскопии и электронной микродифракции (рис. 3).

Полученные микроэлектронные изображения позволили установить, что все синтезированные наночастицы представляют собой многоядерные структуры, содержащие от 2 до 30 ядер магнетита и имеющие сплошную оболочку из оксида кремния толщиной от 2 (рис. 3А) до 30 нм (рис. 3В). Частицы  $m\text{-CMD-SiO}_2$  в среднем были более многоядерными, чем  $m\text{-cit-SiO}_2$ , и имели предел детекции 2.7 нг в 20 мкл раствора, что сравнимо или превосходит множество широко используемых в магнитометрии

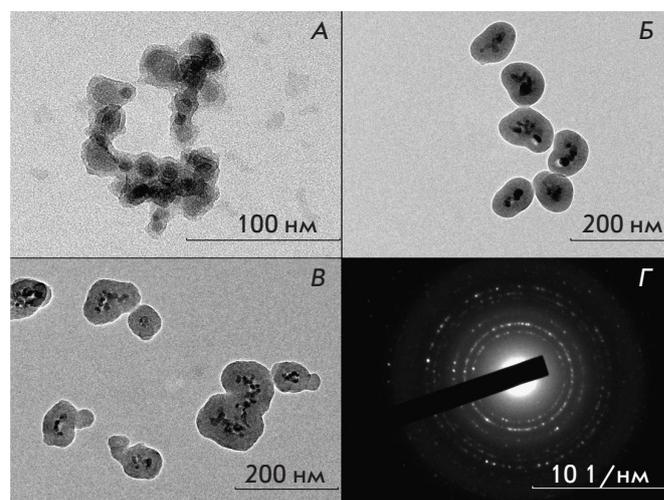
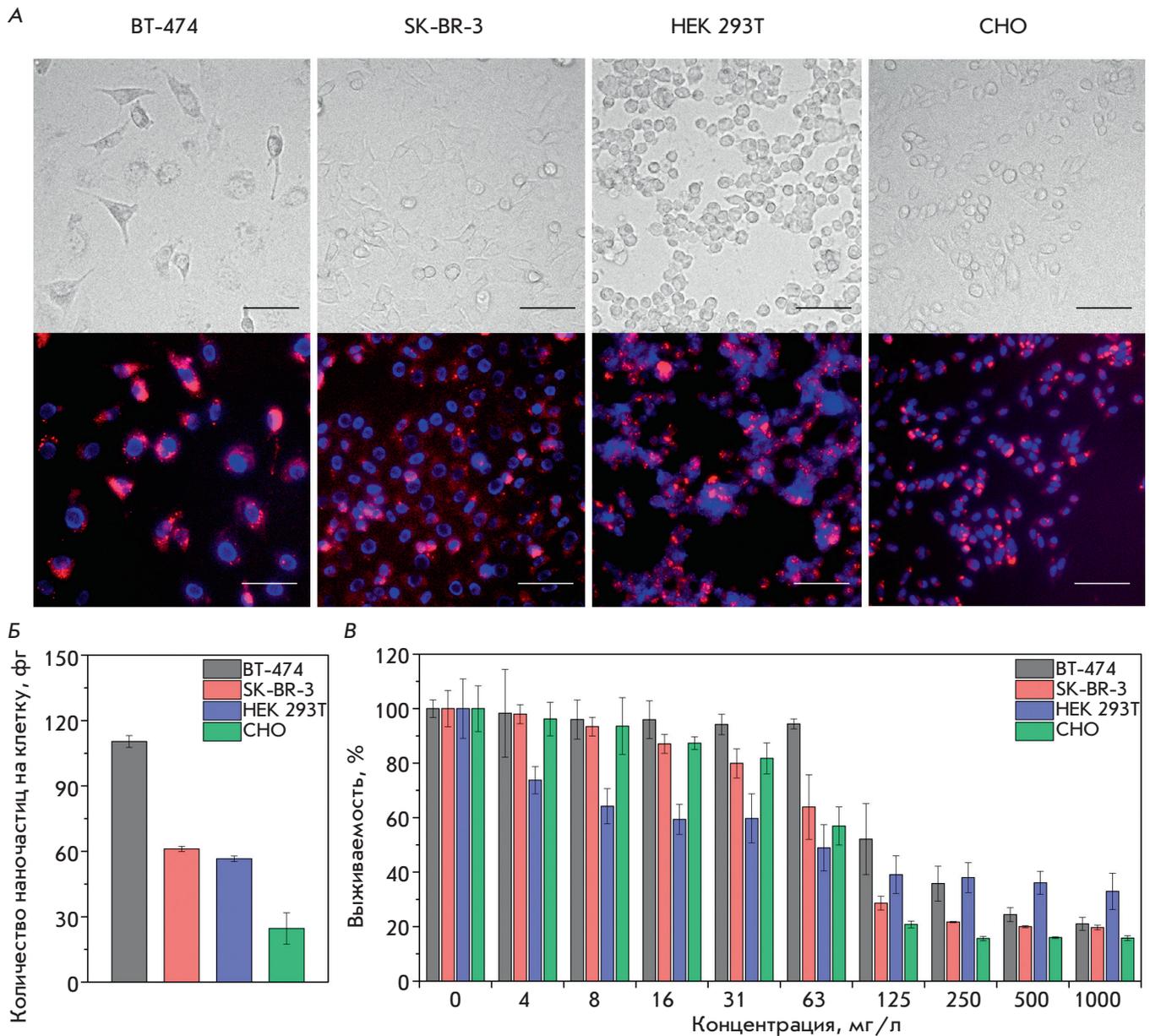


Рис. 3. Электронные микрофотографии типичного строения магнитно-кремниевых наночастиц. Частицы были синтезированы в метаноле (А) и этаноле (Б) через промежуточное покрытие цитрат-анионом, в этаноле через промежуточное покрытие карбоксиметилдекстраном (В). Г — картина дифракции электронов на образце наночастиц магнетита



**Рис. 4.** Мечение клеток эукариот синтезированными магнитно-флуоресцентными наночастицами  $m\text{-CMD-SiO}_2$ . А – флуоресцентная микроскопия: визуализация клеток различного происхождения наночастицами  $m\text{-CMD-SiO}_2$ . Верхняя панель: изображения в проходящем свете. Нижняя панель – наложение изображений при возбуждении флуоресценции (для наночастиц – возбуждение 545/30, эмиссия 610/75, для окрашивания ядер клеток красителем Hoechst 33342 – возбуждение 360/40, эмиссия 470/40). Шкалы – 75 мкм. Б – взаимодействие наночастиц  $m\text{-CMD-SiO}_2$  с клетками, измеренное методом MPQ-цитометрии. В – цитотоксичность наночастиц  $m\text{-CMD-SiO}_2$

методов. Следует отметить, что размер наночастиц, определенный в результате анализа изображений, согласуется с данными, полученными методом динамического светорассеяния. Изучение дифракционного спектра магнитных ядер показало, что ядра состоят из магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , кристаллографическая группа типа Fd3m (кубическая система), основные

межплоскостные расстояния в кристалле – 0.49; 0.29; 0.25; 0.21; 0.17; 0.15 нм. Самая сильная линия – 0.25 нм.

Синтез магнитных наночастиц, способных эффективно взаимодействовать с поверхностью живых клеток, востребован в таких областях, как МРТ-мониторинг стволовых клеток, магнитно-ассоциированная тканевая инженерия, магнетофекция эу-

кариотических клеток и ряде других. Предыдущие исследования показали, что одной из важных характеристик, определяющих взаимодействие частиц с белками и клетками, является величина дзета-потенциала [25]. В то время как положительный заряд на поверхности частицы приводит к более активной адсорбции белков, сильный отрицательный заряд существенно увеличивает эффективность клеточного поглощения частиц [25].

В данной работе показано эффективное мечение отрицательно заряженными  $m\text{-CMD-SiO}_2$ -частицами эукариотических клеток различного тканевого происхождения, полученных из разных организмов. Клеточные линии BT-474, SK-BR-3, НЕК 293Т, СНО инкубировали с наночастицами и отмывали от несвязавшихся частиц для дальнейшего анализа. С использованием флуоресцентной микроскопии установлено, что эти частицы способны эффективно визуализировать клетки эукариот (рис. 4А), сохраняя при этом целостность клеточной мембраны. При взаимодействии с мембраной клеток частицы, несмотря на их высокую коллоидную стабильность, проявляли склонность к образованию ярких и визуально детектируемых крупных конгломератов.

Наночастицы, используемые в качестве маркеров клеточной поверхности, должны обладать высокой биосовместимостью. Поэтому мы сравнили цитотоксичность частиц в формате МТТ-теста. При концентрации наночастиц, использованной для визуализации клеток, а именно 0.01 г/л, более 85% клеток (за исключением линии НЕК 293Т) сохраняло свою жизнеспособность (рис. 4В). При этом для всех четырех клеточных линий  $IC_{50}$   $m\text{-CMD-SiO}_2$ -частиц находилось в диапазоне 63–125 мг/л, что говорит об их низкой цитотоксичности, сравнимой с токсичностью других используемых *in vivo* магнитных наночастиц [26].

Интересно отметить, что флуоресцентные соединения на основе рутения (II) предлагается использовать в качестве химиотерапевтического агента [27]. Однако в нашем случае наличие рутения (II) не сильно влияло на токсичность частиц, вероятно, за счет его прочной фиксации в сплошной оболочке оксида кремния.

Физико-химические свойства этих частиц, такие, как флуоресценция, магнетизм, а также возможность эффективной модификации биомолекулами, делают особенно перспективным их диагностическое использование. Эти наночастицы позволяют проводить одновременно и визуализацию, и количественную детекцию накопления данных частиц в исследуемых местах локализации. Так, методом МРQ-цитометрии мы провели количественное ис-

следование взаимодействия наночастиц  $m\text{-CMD-SiO}_2$  с указанными клеточными линиями и выявили статистически различное накопление наночастиц в различных клетках, выраженное в массовом содержании частиц на клетку (BT-474:  $110.4 \pm 1.3$ , SK-BR-3:  $61.1 \pm 1.2$ , НЕК 293Т:  $56.6 \pm 1.3$ , СНО:  $24.6 \pm 7.2$  фг/клетку). Можно отметить, что даже более малые количества магнитных частиц, связанных с клетками, достаточны не только для *in vitro* визуализации клеток, но и для трекинга клеток в живом организме [28].

Таким образом, нами получены магнитные и магнитно-флуоресцентные частицы с заданным функционалом: магнетизм, флуоресценция, контролируемые поверхностные свойства. Данные частицы были эффективно использованы для мечения клеток эукариот с сохранением целостности и жизнеспособности клеток. Эти частицы можно с высокой чувствительностью детектировать оригинальным методом регистрации нелинейных магнетиков. Синтезированные нами наночастицы, покрытые  $SiO_2$ , можно далее «оснастить» молекулами различных биополимеров [29] и использовать для направленной терапии. Кроме того, они могут выступать в качестве перспективных маркеров клеточной поверхности, используемых в биологии и биомедицине: молекулярной и клеточной биологии, инженерии тканей, различных форматах иммуноанализа, а также в областях нанобиотехнологии, где необходимо высокоэффективное мечение клеток магнитными частицами с целью дальнейшего воздействия на полученные комплексы «клетка–наночастица» [30]. ●

*Исследование выполнено при частичной поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 14-24-00106-П (синтез, модификация и изучение стабильности магнитно-кремниевых наночастиц), Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 17-02-01415 (характеризация строения наночастиц и количественная детекция магнитных маркеров), Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол\_эв\_а» (работа с клеточными культурами, анализ цитотоксичности, флуоресцентная микроскопия).*

*Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEF162117X0018.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoo D., Lee J. H., Shin T. H., Cheon J. // *Accounts Chem. Res.* 2011. V. 44. № 10. P. 863–874.
2. Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. № 2. P. 950–961.
3. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 277–296.
4. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *Nature Nanotechnol.* 2014. V. 9. № 9. P. 716–722.
5. Wang Y., Shim M.S., Levinson N.S., Sung H.W., Xia Y. // *Adv. Funct. Materials.* 2014. V. 24. № 27. P. 4206–4220.
6. Huang J., Zhong X., Wang L., Yang L., Mao H. // *Theranostics.* 2012. V. 2. № 1. P. 86–102.
7. Gleich B., Weizenecker J. // *Nature.* 2005. V. 435. № 7046. P. 1214–1217.
8. Wilhelm C., Gazeau F., Bacri J.C. // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 31. № 2. P. 118–125.
9. Devkota J., Kokkinis G., Berris T., Jamalieh M., Cardoso S., Cardoso F., Srikanth H., Phan M.H., Giouroudi I. // *RSC Advances.* 2015. V. 5. № 63. P. 51169–51175.
10. Gutierrez L., Mejias R., Barber D.F., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C.J., Lazaro F.J., Morales M.P. // *J. Physics D: Appl. Physics.* 2011. V. 44. № 25. P. 255002.
11. Quini C.C., Prospero A.G., Calabresi M.F., Moretto G.M., Zufelato N., Krishnan S., Pina D.R., Oliveira G.M., Baffa O., Bakuzis A.F., et al. // *Nanomedicine: NBM.* 2017. V. 13. № 4. P. 1519–1529.
12. Levy M., Luciani N., Alloyeau D., Elgrabli D., Deveaux V., Pechoux C., Chat S., Wang G., Vats N., Gendron F., et al. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 16. P. 3988–3999.
13. Nikitin M.P., Vetoshko P.M., Brusnetsov N.A., Nikitin P.I. // *J. Magnetism Magnetic Materials.* 2009. V. 321. № 10. P. 1658–1661.
14. Xi Z., Zheng B., Wang C. // *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* 2016. V. 8. № 12. P. 1061–1066.
15. Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Wu C.W., Lin V.S.Y. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008. V. 60. № 11. P. 1278–1288.
16. Stober W., Fink A., Bohn E. // *J. Colloidal Interface Sci.* 1968. V. 26. № 1. P. 62–69.
17. Weissleder R., Nahrendorf M., Pittet M.J. // *Nat. Materials.* 2014. V. 13. № 2. P. 125–138.
18. Shipunova V.O., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Deyev S.M. // *Nanoscale.* 2016. V. 8. № 25. P. 12764–12772.
19. Sakurai S., Namai A., Hashimoto K., Ohkoshi S.I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 51. P. 18299–18303.
20. Yang D., Hu J., Fu S. // *J. Phys. Chem. C.* 2009. V. 113. P. 7646–7651.
21. Mansour H.M., Rhee Y.S., Wu X. // *Int. J. Nanomed.* 2009. V. 4. P. 299–319.
22. Qian L., Yang X.R. // *Adv. Funct. Materials.* 2007. V. 17. № 8. P. 1353–1358.
23. Wu X., Liu H., Liu J., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M.P. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 41–46.
24. Zhang J., Roll D., Geddes C.D., Lakowicz J.R. // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. № 32. P. 12210–12214.
25. Patil S., Sandberg A., Heckert E., Self W., Seal S. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. № 31. P. 4600–4607.
26. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M. // *Iranian Biomed. J.* 2016. V. 20. № 1. P. 1–11.
27. Han Ang W., Dyson P.J. // *Eur. J. Inorganic Chem.* 2006. V. 2006. № 20. P. 4003–4018.
28. Lu C.W., Hung Y., Hsiao J.K., Yao M., Chung T.H., Lin Y.S., Wu S.H., Hsu S.H., Liu H.M., Mou C.Y., et al. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 1. P. 149–154.
29. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. P. 1–26.
30. Merkoci A. // *Biosensors Bioelectronics.* 2010. V. 26. № 4. P. 1164–1177.