

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА МАССАРТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА С ЗАДАНЫМИ РАЗМЕРАМИ

Комиссарова Л.Х.<sup>1</sup>, Татиколов А.С.<sup>1</sup>, Марнаутов Н.А.<sup>1</sup>, Ерохин В.Г.<sup>1</sup>, Семенов В.А.<sup>1</sup>,  
Ларкина Е.А.<sup>2</sup>, Скорая Ю.А.<sup>2</sup>, Барина О.П.<sup>3</sup>, Васильков О.О.<sup>3</sup>, Елфимов А.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

*ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ*

<sup>2</sup>Московский государственный университет информационных технологий, радиотехники и электроники  
*пр. Вернадского, 78, г. Москва, 119454, РФ*

<sup>3</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

*Миусская пл., 9, г. Москва, 125047, РФ*

*e-mail: norron@mail.ru*

**Аннотация.** Показано, что для получения биосовместимых наночастиц магнетита с заданными размерами: 14±6 нм методом Массарта целесообразно проведение реакции в инертной атмосфере (аргон). Подобраны оптимальные условия процесса: концентрации солей, температура, время реакции и скорость перемешивания. Методами просвечивающей электронной микроскопии, электронной дифракции и др. изучены размер, структура и химический состав частиц. Путем в/б введения препарата интактным мышам показано, что полученные наночастицы не токсичны и могут быть использованы для биомедицинских целей, в том числе в качестве носителей лекарств для направленной доставки в опухоль.

**Ключевые слова:** метод Массарта, биосовместимые наночастицы магнетита, инертная атмосфера, просвечивающая электронная микроскопия, токсичность препарата

## OPTIMIZING MASSART METHOD FOR OBTAINING BIOCOMPATIBLE MAGNETITE NANOPARTICLES OF GIVEN SIZES

Komissarova L.Kh.<sup>1</sup>, Tatikolov A.S.<sup>1</sup>, Marnautov N.A.<sup>1</sup>, Erohin V.N.<sup>1</sup>, Semenov V.A.<sup>1</sup>,  
Larkina E.A.<sup>2</sup>, Skoraya Yu.A.<sup>2</sup>, Barinova O.P.<sup>3</sup>, Vasilkov O.O.<sup>3</sup>, Elfimov A.B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

*Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia*

<sup>2</sup>Moscow State University of Information Technologies, Radio Engineering and Radio Electronics  
*Vernadsky av., 78, Moscow, 119454, Russia*

<sup>3</sup>Russian Chemico-Technological University of D.I. Mendeleev

*Miuskaya Sq., 9, Moscow, 125047, Russia*

*e-mail: norron@mail.ru*

**Abstract.** It has been shown that in order to obtain biocompatible magnetite nanoparticles of 14±6 nm in size by the Massart method it is worthwhile to conduct the reaction in an inert atmosphere (argon). The process conditions have been optimized: concentrations of the salts, temperature, reaction time and stirring speed. Sizes, structure and chemical composition of the particles were studied by transmission electron microscopy, electron diffraction and other methods. By intraperitoneal injecting the preparation to intact mice we have shown that the obtained nanoparticles are non-toxic and may be used for biomedical purposes, including as drugs carriers for target delivery to a tumor.

**Key words:** the Massart method, biocompatible magnetite nanoparticles, an inert atmosphere, transmission electron microscopy, toxicity of the preparation

**Введение.** Интерес к наноразмерным материалам возрастает с каждым годом в течение последних пятнадцати лет. Особую нишу среди наноматериалов занимают магнитные наночастицы. Магнитные наночастицы активно используются в промышленности в качестве катализаторов [1], поглотителей мышьяка [2], магнитных запоминающих устройств [3]. Но наибольшее внимание они привлекают в биомедицине, где их можно использовать для направленной доставки лекарств [4], в терапии опухолей [5], а также в качестве биосенсоров [6] и контрастирующих агентов для МРТ [7].

Описано много способов получения магнитных наночастиц, наиболее распространенными являются: метод высокотемпературного разложения органической соли металла в высококипящем органическом растворителе [8, 9], микроэмульсионный метод [10, 11], а также метод химического соосаждения [12]. Метод соосаждения, так называемый метод Массарта, является одним из основных методов получения наночастиц магнетита. Однако, несмотря на значительное количество работ, связанных с получением наночастиц магнетита этим методом, из-за варьирования условий проведения реакции, физико-химические свойства получаемых наночастиц магнетита и, в первую очередь их размеры, сильно отличаются.

Задачами нашей работы является разработка воспроизводимой методики синтеза биосовместимых наночастиц магнетита заданного размера на основе метода Массарта путем подбора оптимальных условий проведения реакции: среды (наличие или отсутствие инертной атмосферы), а также концентрации и соотношения солей железа, времени реакции и температуры, скорости перемешивания. Размеры, структура и химический состав наночастиц были изучены методами просвечивающей электронной микроскопии, электронной дифракции и др. Исследована токсичность частиц путем внутрибрюшинного введения препарата интактным мышам.

**Экспериментальная часть.**

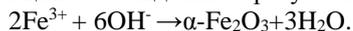
**Материалы.** В работе использовались хлорид железа (III) шестиводный, хлорид железа (II), сульфат железа (II) семиводный марки «хч» (99 %, «Acros»), аммиак водный (98.5 %, «Компонент Реактив»). Во всех экспериментах использовалась дистиллированная вода, если не указано иное. Для характеристики размеров, структуры и химического состава наночастиц использовали ряд методов, в том числе, просвечивающая электронная микроскопия (LEO-912 AB, Zeiss, Германия), рентгеноструктурный анализ и др.

**Методика эксперимента.** Процесс синтеза магнитных наночастиц по методу Массарта путем соосаждения солей двухвалентного и трехвалентного железа в щелочной среде протекает по следующей схеме:



Опыты проводились следующим образом. В трехгорлой круглодонной колбе к дистиллированной воде, предварительно подкисленной соляной кислотой до pH 2, добавляется смесь хлоридов железа (II) и (III) в мольном соотношении 1:2, в количестве, необходимом для образования раствора с содержанием 0.5-12 масс. % смеси хлорида железа (II) и (III). Затем к реакционной смеси при постоянном перемешивании добавляли водный раствор аммиака (8 об. %). В ряде опытов реакция проводилась при комнатной температуре в течение 15 мин, в других опытах - при температуре 70-80 °С в течение 30-40 мин. Наночастицы осаждали с помощью магнитной сепарации, постоянным Sm-Co магнитом с индукцией на поверхности 3 мТ. Супернантант отбрасывали, осадок ресуспендировали в дистиллированной воде, процедуру повторяли многократно до достижения значения pH 7 в промывных водах. Для получения сухого остатка частицы сушили в эксикаторе под вакуумом до постоянного веса.

**Результаты и обсуждение.** Было проведено четырнадцать опытов в атмосфере воздуха. В результате четырех опытов была получена немагнитная жидкость оранжевого цвета, в десяти других – магнитные жидкости, их цвет в шести случаях был черным, в четырех желто-бурым, что указывает на значительную примесь  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Реакции проводились не более 10-15 мин, чтобы предотвратить окисление. Различия в полученных продуктах могут быть объяснены как количеством окислившегося  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$ , так и степенью старения  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  до  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  в щелочной среде в присутствии кислорода воздуха. Вероятно, при увеличении скорости перемешивания, в результате попадания в реакционную смесь кислорода воздуха, ускоряется окисление  $\text{Fe}^{2+}$ , в результате чего в ходе реакции соосаждения образуется не  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , а  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ :



$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  в отличие от  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  не является ферримагнетиком, чем объясняется образование немагнитной суспензии оранжевого цвета. Несмотря на то, что крупноразмерный магнетит весьма устойчив к окислению кислородом воздуха, наноразмерный магнетит довольно легко подвергается окислению на стадии роста наночастиц в щелочной среде и переходит в  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , что объясняет образование магнитоуправляемой суспензии желто-бурого цвета.

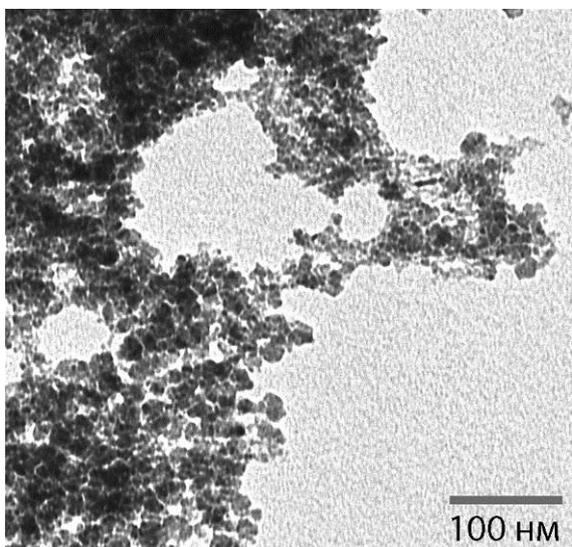


Рисунок 1 – Электронные микрофотографии наночастиц магнетита (опыт № 9)

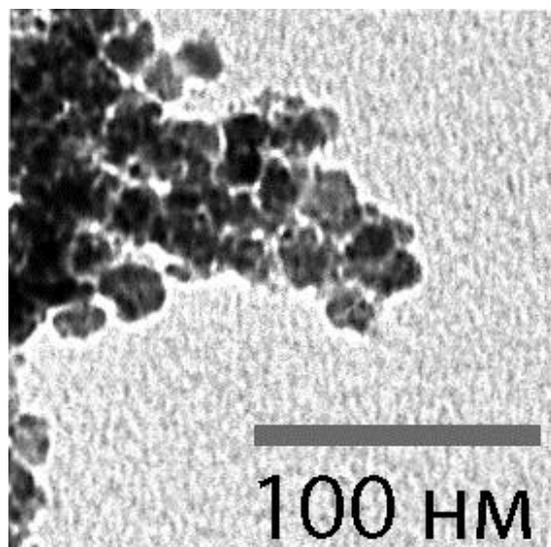


Рисунок 2 – Электронные микрофотографии наночастиц магнетита (опыт № 10)

На рисунках 1 и 2 приведены электронные микрофотографии, наночастиц магнетита, полученных в атмосфере воздуха (опыты № 9 и 10). Средний размер частиц составил:  $8 \pm 4$  нм.

При проведении реакций в атмосфере воздуха даже при одинаковой скорости перемешивания и концентрации солей получались разные продукты: магнитоуправляемые суспензии желто-бурого и черного цветов. Данная особенность указывает на крайне высокую зависимость данного метода от трудно контролируемых факторов при проведении реакции в атмосфере воздуха в присутствии кислорода, поэтому последующие опыты проводились в атмосфере аргона.

В атмосфере аргона во всех опытах была получена магнитоуправляемая суспензия черного цвета. Отсутствие кислорода позволило увеличить скорость перемешивания (900 об/мин), а также увеличить время реакции и повысить температуру. Повышение температуры до 70-80 °С и увеличение времени реакции до 30-40 мин обеспечило полное протекание реакции и «вызревание» наночастиц, в результате чего они при разведении способны были образовать золь. Проведен ряд опытов с исходной концентрацией солей 2 %, 4 %, 8 % и 12 %, все опыты показали похожие результаты (см. рис. 3). Значительной разницы в размерах образовавшихся наночастиц не обнаружено, из чего можно сделать вывод, что при времени реакции 30-40 мин исходная концентрация солей играет ограниченную роль. На рисунке 3 представлена микрофотография наночастиц, синтезированных при общей концентрации солей  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12 %. Микрофотографии, полученные в других опытах, с исходной концентрацией солей 2-8 %, отличаются незначительно. Средний размер частиц составил  $14 \pm 6$  нм.

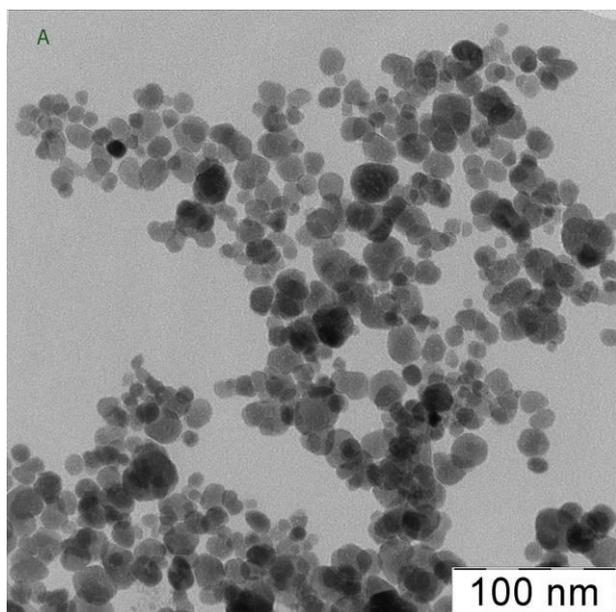


Рисунок 3 – Электронные микрофотографии наночастиц магнетита, полученных при концентрации солей 12 % в атмосфере аргона

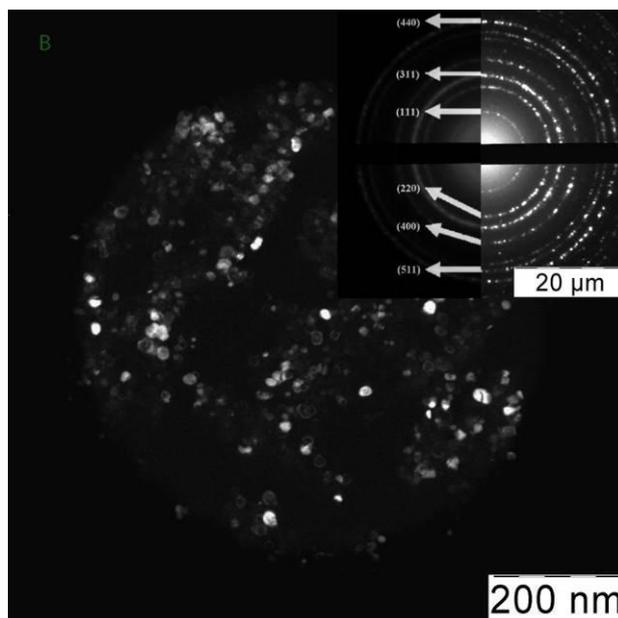


Рисунок 4 – Микрофотографии наночастиц в темном поле и электронная дифракция этих частиц

Химический состав наночастиц был подтвержден с помощью электронной дифракции (см. рис. 4).

Таким образом, для получения воспроизводимых результатов по синтезу биосовместимых наночастиц магнетита заданного размера  $14 \pm 6$  нм методом Массарта является целесообразным проведение реакции в инертной атмосфере (аргон) с концентрацией солей 12 %, температуре 70-80 °С, времени реакции 30-40 мин, скорости перемешивания 900 об/мин.

Для изучения токсических свойств синтезированных наночастиц магнетита использовались белые беспородные мыши, которым однократно внутрибрюшинно по 0.3 мл вводили препарат в физиологическом растворе в следующих дозах: 3.3 г/кг (220 мг/мл, гель), 1.65 г/кг, 0.8 г/кг, 0.4 г/кг, 0.2 г/кг. В каждой группе было по 6 животных. Ни в одной из групп не было отмечено гибели животных (наблюдение проводилось в течение месяца). Отсюда можно заключить, что данный препарат нетоксичен и поэтому может использоваться как носитель лекарственных средств, в том числе противоопухолевых.

**Заключение.** Показано, что для получения биосовместимых наночастиц магнетита с заданными размерами:  $14 \pm 6$  нм методом Массарта целесообразно проведение реакции в инертной атмосфере (аргон). Подобраны оптимальные условия процесса: концентрации солей, температура, время реакции и скорость перемешивания. Методами просвечивающей электронной микроскопии, электронной дифракции и др. изучены размер, структура и химический состав частиц. Путем внутрибрюшинного введения препарата интактным мышам показано, что полученные наночастицы нетоксичны и могут быть использованы для биомедицинских целей, в том числе в качестве носителей лекарств для направленной доставки в опухоль.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 16-03-00735.*

#### Список литературы / References:

1. Hu A., Yee G.T., Lin W. Magnetically recoverable chiral catalysts immobilized on magnetite nanoparticles for asymmetric hydrogenation of aromatic ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, pp. 12486-12487.
2. Akin I., Arslan G., Tor A., Ersoz M., Cengeloglu Y. Arsenic(V) removal from underground water by magnetic nanoparticles synthesized from waste red mud. *J. Hazard. Mater.*, 2012, vol. 235-236, pp. 62-68.
3. Sun S., Murray C.B., Weller D., Folks L., Moser A. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science*, 2000, vol. 287, pp. 1989-1992.

4. Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharm. Res.*, 2010, vol. 62, pp. 144-149.
5. Mulens V., Morales M.P., Barber D.F. Development of magnetic nanoparticles for cancer gene therapy: a comprehensive review. *Hindawi Publishing Corporation, ISRN Nanomaterials*, vol. 2013, Article ID 646284, 14 pages.
6. Miller M.M., Prinz G.A., Cheng S.F., Bounnak S. Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor. *Appl. Phys. Lett.*, 2002, vol. 81, no. 12, pp. 2211-2213.
7. Felton C., Karmakar A., Gartia Y., Ramidi P., Biris A.S., Ghosh A. Magnetic nanoparticles as contrast agents in biomedical imaging: recent advances in iron- and manganese-based magnetic nanoparticles. *Drug Metab. Rev.*, 2014, vol. 46, no. 2, pp. 142-154.
8. Rockenberger J., Scher E.C., Alivisatos A.P. A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 11595-11596.
9. Biddlecombe G.B., Gun'ko Y.K., Kelly J.M., Pillai S.C., Coey J.M.D., Venkatesan M., Douvalis A.P. Preparation of magnetic nanoparticles and their assemblies using a new Fe(II) alkoxide precursor. *J. Mater. Chem.*, 2001, vol. 11, pp. 2937-2939.
10. Inouye K., Endo R., Otsuka Y., Miyashiro K., Kaneko K., Ishikawa T. Oxygenation of ferrous ions in reversed micelle and reversed microemulsion. *J. Phys. Chem.*, 1982, vol. 86, pp. 1465-1469.
11. Duxin N., Stephan O., Petit C., Bonville P., Colliex C., Pileni M.P. Pure  $\alpha$ -Fe coated by an  $\text{Fe}_{1-x}\text{B}_x$  alloy. *Chem. Mater.*, 1997, vol. 9, pp. 2096-2100.
12. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.*, 1981, vol. 17, pp. 1247-1248.

### НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НЕ ЯВЛЯЮТСЯ ТОКСИЧНЫМИ ДЛЯ МСК ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБНЫ СТИМУЛИРОВАТЬ ИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ *IN VITRO*

Попов А.Л.<sup>1</sup>, Попова Н.Р.<sup>1</sup>, Иванов В.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН  
ул. Институтская, 3, г. Пуцдино, 142290, РФ

<sup>2</sup>Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН  
Ленинский пр., 31, г. Москва 119333, РФ  
e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

**Аннотация.** Разработка и синтез новых функциональных наноматериалов для биомедицинских целей требует обязательного проведения комплексной оценки их токсичности в условиях *in vitro* и *in vivo*. В данной работе проведен анализ агрегативной устойчивости нового типа наночастиц диоксида церия, допированных гадолинием, а также проведено исследование их влияния на пролиферативную и метаболическую активность МСК человека *in vitro*. Показано, что наночастицы диоксида церия не являются токсичными в широком диапазоне концентраций ( $10^{-5}$ - $10^{-9}$  М), а также способны стимулировать пролиферацию МСК человека в дозозависимой манере. Высокая степень биосовместимости и низкая токсичность синтезированных наноматериалов позволяют говорить о перспективности разработки биомедицинских препаратов на их основе.

**Ключевые слова:** наночастицы диоксида церия, пролиферативная активность, МСК человека

### CERIUM OXIDE NANOPARTICLES ARE NOT TOXIC FOR HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND ARE ABLE TO STIMULATE THEIR PROLIFERATION *IN VITRO*

Popov A.L.<sup>1</sup>, Popova N.R.<sup>1</sup>, Ivanov V.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of theoretical and experimental biophysics RAS  
Institutskaya St., 3, Pushchino, 142290, Russia

<sup>2</sup>Kurnakov institute of general and inorganic chemistry RAS  
Leninskii av., 31, Moscow, Russia  
e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

**Abstract.** Design and synthesis of new nanomaterials for biomedical applications require a comprehensive assessment of their toxicity *in vitro* and *in vivo*. We analyzed the aggregate stability of new types of cerium oxide nanoparticles doped with gadolinium and checked their influence on the proliferative and metabolic activity of human fibroblast *in vitro*. It has been shown that cerium oxide nanoparticles are not toxic in a wide range of concentrations ( $10^{-5}$ - $10^{-9}$  M), and are able to stimulate proliferation of the human MSCs in a dose-dependent manner. The high degree of biocompatibility and low toxicity of synthesized nanomaterials allow us to consider it as perspective compound for development of biomedical products.

**Key words:** cerium oxide nanoparticles, proliferative activity, human mesenchymal stem cells

**Введение.** Наночастицы диоксида церия находят широкое применение во многих промышленных приложениях, в том числе в качестве абразивов [1], катализаторов [2] и топливных элементов [3]. Высокий уровень кислородной нестехиометрии и редокс-активность поверхности, а также низкая токсичность и биосовместимость делают наночастицы диоксида церия весьма перспективным материалом в биомедицинских