

УДК 5:54:54-4: 537:576:577

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДЕЛОВ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ γ -Fe₂O₃ КУЛЬТУРАМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Е. А. Бурбан^{1,*}, Ф. А. Фадеев^{2,3}, А. П. Сафронов^{1,4}, Ф. А. Бляхман^{1,3}, Т. В. Терзиян¹, Д. С. Незнахин¹, А. А. Юшков¹, Г. В. Курляндская¹

¹Уральский федеральный университет,

ул. Мира, 19, Екатеринбург, 620002 Россия

²Институт медицинских клеточных технологий,

ул. Карла Маркса, 22А, Екатеринбург, 620026 Россия

³Уральский государственный медицинский университет,

ул. Репина, 3, Екатеринбург, 620028 Россия

⁴Институт электрофизики Уральского отделения РАН,

ул. Амундсена, 106, Екатеринбург, 620016 Россия

*e-mail: e.a.mikhnevich@urfu.ru

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 08.08.2024 г.

Принята к публикации 08.08.2024 г.

В работе исследована культура костномозговых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, выращенная в виде монослоя в питательной среде, в которую введена стабилизированная водная суспензия магнитных наночастиц (МНЧ) маггемита (γ -Fe₂O₃), синтезированных электрофизическим методом лазерного испарения мишени. Предложен способ стабилизации суспензии в условиях питательной среды с высокой ионной силой. Проведена качественная оценка возможности интернализации (либо закрепления на клеточной мембране, либо проникновения внутрь клеточного пространства) МНЧ клетками при помощи оптической, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии и СКВИД-магнитометрии. Приведен сравнительный анализ структуры и магнитных свойств и сделаны предположения об особенностях акцепции МНЧ клетками в данной системе. Установлено, что предельным значением, которое достоверно можно анализировать в биологическом образце рассматриваемого типа с МНЧ данного типа является величина около 0.005 мг. Обнаружено, что в рассматриваемом интервале исходных концентраций МНЧ в биологических образцах на основе МСК человека уровень накопления магнитных наночастиц в клеточных культурах зависит от их концентрации.

Ключевые слова: метод лазерного испарения мишени, магнитные наночастицы, маггемит, стабилизированные водные суспензии, мезенхимальные стромальные клетки человека, просвечивающая электронная микроскопия, магнитные измерения

DOI: 10.31857/S0023291224060023, **EDN:** VLRUNM

ВВЕДЕНИЕ

Магнитные микро- и наночастицы (МНЧ) оксидов железа — это достаточно хорошо изученные материалы, интерес к которым продолжает возрастать ввиду их интересных особенностей с точки зрения фундаментальных аспектов физики магнитных материалов, а также технических и биомедицинских приложений [1–3]. Хотя большая часть биоприложений ориентирована на ансамбли магнитных наночастиц

с узким распределением по размерам [2, 4], а теоретические расчеты проводятся преимущественно для ансамблей идентичных суперпарамагнитных МНЧ магнетита [5], на практике получение больших партий таких материалов затруднено [6]. При этом если на уровне взаимодействия с нормальной клеточной мембраной или здоровой тканью требование узкого распределения по размерам критически важно, то в случае опухолевых клеток с нарушениями стандартных морфологических параметров или сосудов,

подверженных быстрому росту в процессе ангиогенеза, возможны варианты использования партий с более широким распределением МНЧ по размерам. Ангиогенез — это процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани, который в случае злокачественных опухолей протекает постоянно и очень интенсивно [7–8]. В кровеносных сосудах с нормальной морфологией размер пор варьируется незначительно, между 2 и 6 нм. В случае кровеносных сосудов, пронизывающих раковую опухоль, как размеры пор, так и вариация этих размеров могут быть значительно больше, составляя от 2 до даже 300 нм [8]. Поскольку для проведения некоторых видов терапии (таких как гипертермия или термическая абляция) часто важен общий объем магнитного материала, попавшего в зону воздействия, предложенная постановка задачи для ансамбля МНЧ с широким распределением по размерам кажется вполне оправданной.

Кроме того, скопления магнитных наночастиц в биологических образцах чаще всего отражают особенности многоуровневой биологической организации. Например, было установлено, что при определенных условиях взаимодействия электростатически стабилизированных водных суспензий на основе МНЧ маггемита с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками человека (МСК), МНЧ аккумулировались в митохондриях в виде больших агрегатов, на определенном уровне повторяющих исходную структуру этих органелл [9]. Важной задачей биомедицинских приложений является и определение положения таргетированных скоплений МНЧ и их морфологии. Для ее решения необходимы работы по созданию и исследованию модельных агрегатов таких образований с целью их магнитного детектирования.

Частицы магнетита (Fe_3O_4) или маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) — это доступные магнитные наноматериалы с высокой степенью биосовместимости, которые могут быть получены в виде больших партий с различными параметрами дисперсности методами электрического взрыва проволоки или лазерного испарения мишени (ЛИМ) [3, 10–11]. На их основе можно создавать различные по свойствам магнитные композиты в широком диапазоне концентраций наночастиц [12]. Такие композиты также могут быть использованы при адресной доставке лекарств [12–13], например, при тромбозе, где их связывают с лекарством-тромболитиком, а затем доставляют в область тромба, тем самым создавая терапевтически значимую локальную концентрацию и уменьшая побочные эффекты [12].

Вопрос о возможности определения количества магнитных наночастиц, ассоциированных с одной клеткой, и области их расположения (снаружи на клеточной мембране, внутри клетки у клеточной мембраны, в цитоплазме клетки, снаружи или внутри конкретных органелл) представляет собой важную

проблему, решаемую в настоящее время научным сообществом [1–3]. Исследования структуры посредством просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при использовании стандартных биопротоколов предполагают осуществление длительной и дорогостоящей пробоподготовки, но дают четкое понимание о локализации МНЧ. Например, в работе [9] стабилизированные суспензии на водной основе получали с использованием электростатической или стерической стабилизации природным полимером хитозаном для экспериментов *in vitro* с мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани человека для предельно допустимой концентрации (ПДК) МНЧ 100. В настоящее время нормативные акты по содержанию определенного количества наночастиц оксидов железа не приняты. В их отсутствие в публикациях используются ПДК для содержания в воде железа в ионной форме: ПДК железа в воде составляет 0.3 мг/л [9]. Внутриклеточные включения МНЧ четко наблюдались преимущественно внутри органелл клеток, контактировавших с 100 ПДК электростатически стабилизированной суспензии. Агрегаты МНЧ были обнаружены внутри эндосом, по контуру гидролитических везикул/секреторных гранул и внешней мембраны митохондрий, и только единичные включения свободно располагались в цитоплазме клеток. Однако фиксация в 1% тетраоксиде осмия в буфере Соренсона, обезвоживание, подбор подходящей эпоксидной смолы Epon Polarbed и получение качественных ультратонких срезов толщиной 70 нм для исследований с помощью ПЭМ [9, 14] в настоящее время доступно крайне редко. Поэтому возникает необходимость проведения поисковых работ, связанных с допустимостью и условиями использования упрощенных протоколов (без специальной пробоподготовки биообразцов) и магнитных измерений в режимах, чаще всего используемых для физических измерений наноматериалов. Для проведения данного исследования были выбраны МНЧ и водные стабилизированные суспензии на их основе и культуры МСК, ранее подробно изученные коллективом, что обеспечивало высокую повторяемость и сравнимость результатов с данными предыдущих исследований.

Целью настоящей работы было сравнительное исследование физических свойств биообразцов культуры костномозговых мезенхимальных стромальных клеток человека, выращенных в питательной среде с введением в нее стабилизированной водной суспензии магнитных наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, синтезированных методом лазерного испарения мишени. Особое внимание уделялось возможности качественной оценки степени интернализации (либо закрепления на клеточной мембране, либо проникновения внутрь клеточного пространства) данных наночастиц упомянутыми клеточными культурами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Партия магнитных наночастиц маггемита была получена методом лазерного испарения мишени с использованием технологических параметров и режимов, описанных в работах [3, 9].

Лабораторная установка использует волоконный иттербиевый (Yb) лазер (длина волны 1.07 мкм) и прессованную из коммерческих микрочастиц Fe₃O₄ (Alfa Aesar, США) мишень диаметром 65 мм. Приводной механизм обеспечивал вращение и горизонтальное перемещение мишени внутри испарительной камеры. Оптическая система с фокусным расстоянием 200 мм и диаметром фокального пятна 0.45 мм обеспечивала фокусировку лазерного луча на поверхности мишени. Скорость сканирования составляла 20 см/с при частоте импульсов – 4.85 кГц, и длительности импульса – 60 мкс. Полученные ЛИМ МНЧ были однофазны: постоянная решетки кристаллической фазы лишь несколько выше, чем постоянная решетки маггемита γ -Fe₂O₃. Используемые в данной работе наночастицы были получены в Институте электрофизики УрО РАН, лаборатории импульсных процессов [9, 10–11].

Для получения базовой суспензии для биоэкспериментов навеску наночастиц маггемита диспергировали в 0.2% водном растворе цитрата натрия в течение 15 мин с использованием ультразвукового процессора Cole-Parmer CPX-750 в режиме 75% мощности. В процессе диспергирования обеспечивали непрерывное охлаждение суспензии с помощью водяной рубашки. После диспергирования проводили центрифугирование суспензии в течение 5 мин при скорости вращения ротора 8000 об/мин. При центрифугировании в этих условиях осаждались только агрегаты наночастиц, в то время как их основная часть оставалась в надосадочной суспензии. Осадок удаляли, а к надосадочной суспензии наночастиц добавляли навеску 5% водного раствора полиметакрилата аммония (ММ = 1.6·10⁴) торговой марки DARVAN C-N (R.T. Vanderbilt Co, США), гомогенизировали смесь механическим перемешиванием и прогревали при 90°C в течение 1 часа. Приготовленную таким образом базовую суспензию анализировали и использовали для добавления в питательную среду клеточных культур. Концентрация МНЧ маггемита в базовой суспензии составила 4.24 масс. %. Детали получения суспензии данного типа описаны в работе [10]. Исследования дисперсности и стабильности суспензии проводили методами динамического и электрофоретического рассеяния света с использованием анализатора Brookhaven ZetaPlus.

В биоэкспериментах использована культура костномозговых мезенхимальных стромальных клеток человека. Клетки выращивали в виде монослоя в культуральных флаконах T25 с обработанной для адгезии клеток поверхностью (Jet Biofil, Китай) в ростовой среде DMEM + F-12 (Панэко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки

(FBS) (Biosera, Франция), 0.03% глутамина и гентамицина (50 мкг/мл). При пересеве клетки снимали с пластика с помощью 0.25% раствора трипсина с ЭДТА (Панэко, Россия), трипсин инактивировали раствором Эрла (Панэко) с 10% сыворотки, полученную суспензию центрифугировали при 1100 об/мин 10 минут, после чего сливали надосадочную жидкость и ресуспендировали клеточный осадок в свежей ростовой среде. Полученную суспензию переносили в новые культуральные флаконы (или чашки Петри).

Образцы для электронной микроскопии готовили следующим образом. В чашки Петри с адгезивной поверхностью (Nunc, Дания) вносили суспензию клеток в ростовой среде. Чашки Петри переносили в CO₂-инкубатор и выращивали клетки до формирования монослоя с 70–80% конfluence. Далее в чашки Петри с клеточным монослоем добавляли взвесь МНЧ в требуемом количестве. Были получены и исследованы биообразцы следующих типов:

- контроль клеток без МНЧ;
- клетки с МНЧ в концентрации 1 мкг/см² поверхности монослоя;
- клетки с МНЧ в концентрации 256 мкг/см² поверхности монослоя;
- контроль без клеток: МНЧ в концентрации 256 мкг/см² поверхности.

Через 18 часов после инкубации клеток с МНЧ монослоем во всех чашках Петри был отмыт фосфатным буфером от не связавшихся МНЧ. После отмывки клетки в чашках Петри зафиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида, после чего дегидратировали их этанолом в увеличивающейся концентрации (от 30% до 96%). Плотность клеточного монослоя составляла около 114 тысяч клеток на см². Далее клеточные культуры сушили, не удаляя с культурального пластика, и использовали для измерения шероховатости и магнитных измерений.

Кроме того, использовался и второй метод подготовки образцов. После инкубации клеточный монослой отмывали фосфатным буфером от не адгезированных клетками МНЧ. Клетки снимали с пластика раствором трипсина, после чего фермент инактивировали раствором Эрла с 10% FBS. Клетки осаждали центрифугированием, сливали надосадочную жидкость, клеточный осадок фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида, дегидратировали этанолом в увеличивающейся концентрации (от 30% до 96%) и выдерживали на воздухе до полного испарения остатков спирта и воды. Количество клеток в каждом образце – около 20 млн.

Оптические фотографии с увеличением до ×300 получали с помощью микроскопа Levenhuk Rainbow 50L PLUS. Рельеф поверхности образцов исследовали с помощью стилусного профилометра Veeco Dektak 150 и атомно-силового микроскопа NTEGRA. Электронные микрофотографии получали с помощью

просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония), оснащенного ПЗС-камерой Gatan Orius (Gatan, Inc., США), при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Полевые зависимости намагниченности были измерены с помощью магнитоизмерительной установки MPMS-XL7 EC (Quantum Design, США) с первичным преобразователем на основе СКВИДа (от англ. SQUID, Superconducting Quantum Interference Device – сверхпроводящий квантовый интерферометр). Магнитное поле создается сверхпроводящим соленоидом, намотанным проводом из Nb_3Sn . Максимальное значение напряженностей магнитного поля, создаваемого соленоидом, составляет $H_{max} = \pm 70$ кЭ. В диапазоне ± 5 кЭ возможно изменение магнитного поля с шагом в 0.1 Э; в остальном диапазоне магнитных полей – 1 Э. Показатель точности результатов измерений магнитного момента образцов $\delta(P = 0.95) = \pm 1.0\%$. Пределы допускаемой относительной погрешности установки напряженности магнитного поля $\pm 1.0\%$. Измерения магнитного момента (m) от величины приложенного магнитного поля (H) выполнены при температуре 300 К в поле-вом интервале 0–70 кЭ.

Для проведения магнитных измерений образцы были подготовлены тремя различными способами. 1) Суспензия с концентрацией МНЧ 4.24 масс. % высушивалась в поликарбонатной капсуле. 2) Образцы клеточных препаратов, высушенные на поверхности культурального пластика с концентрациями МНЧ 0, 1 и 256 мкг/см². На чашку Петри наносилась сантиметровая сетка для разбиения на зоны. Для проведения магнитных измерений смывалась часть образца с площади, равной 1 см² (рис. 1). По оптическим свойствам выделенных зон видно, что в процессе роста клеточной культуры возникают области, характеризующиеся некоторыми отличиями в плотности распределения клеточных культур и суспензии. У краев чашки Петри концентрации МНЧ ниже, именно поэтому были выделены 12 рабочих зон с визуально однородным распределением биоматериала, для некоторых из которых проводили магнитные измерения. Отличия измеряемых параметров в этих зонах не превышали 5%. 3) Образцы были предоставлены в виде высушенного сгустка известного количества МСК (пелетов), отделенных от культурального пластика с концентрациями МНЧ 0, 1 и 256 мкг/см². В каждом пелете содержалось около 20 миллионов клеток (см. выше).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средние размеры МНЧ в составе водной суспензии были измерены методом ПЭМ, на основании чего было построено распределение частиц по размерам (рис. 2). МНЧ имели сферическую форму (рис. 2а), а их распределение по размерам было логнормальным при среднем размере МНЧ около 13 ± 2 нм

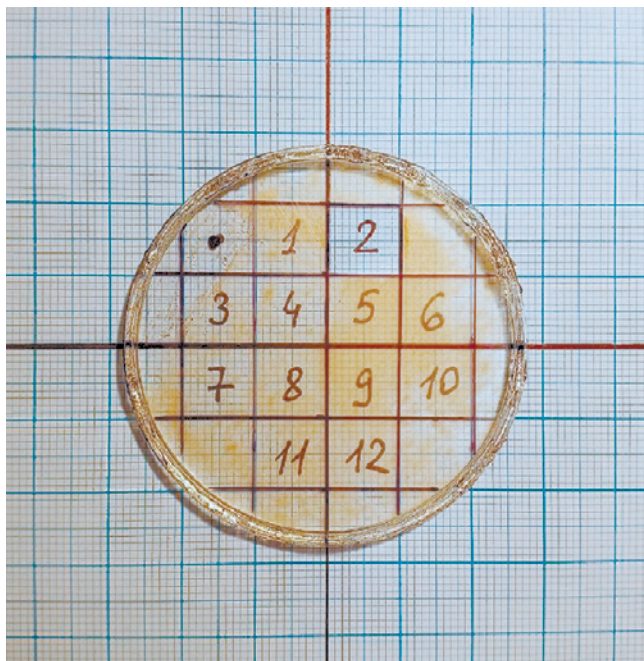


Рис. 1. Общий вид чашки Петри с высушенным образцом культуры МСК при концентрации МНЧ 256 мкг/см² и нанесенной разметкой по зонам. Зона «2» показана после смыва биоматериала.

(рис. 2в). Отметим, что метод ЛИМ позволяет получать очень большие партии наночастиц, обеспечивая возможность проведения целой серии исследований, сравнение данных которых имеет особую ценность, т.к. все работы ведутся в рамках одной партии. Полученные данные о средних размерах МНЧ на основе анализа результатов ПЭМ (13 ± 2 нм) хорошо совпадают с проведенными ранее исследованиями с помощью рентгенофазового анализа (14 ± 2 нм), выполненного на дифрактометре Bruker D8-Advance в излучении $Cu-K\alpha$ [15]. Расчет проведен с использованием формулы Шерера.

Одной из важнейших задач, определяющих использование суспензий наночастиц в биомедицинских целях, является обеспечение их устойчивости в физиологической среде. В рамках поставленной в работе задачи это предполагает два аспекта. Во-первых, обеспечение стабильности применяемой суспензии наночастиц в стандартизованных питательных средах, используемых для культивирования клеток. Во-вторых, это вопрос устойчивости суспензии во внутриклеточной среде при проникновении частиц в клетку. Последнее не поддается контролю, во всяком случае на текущем этапе развития биотехнологии. Что же касается первой задачи, то ее решение стало первым этапом данной работы.

Как было показано в наших предыдущих работах, наночастицы маггемита, синтезируемые методом ЛИМ, могут быть успешно диспергированы в водной среде до отдельных частиц с использованием электростатической стабилизации [16, 17, 18].

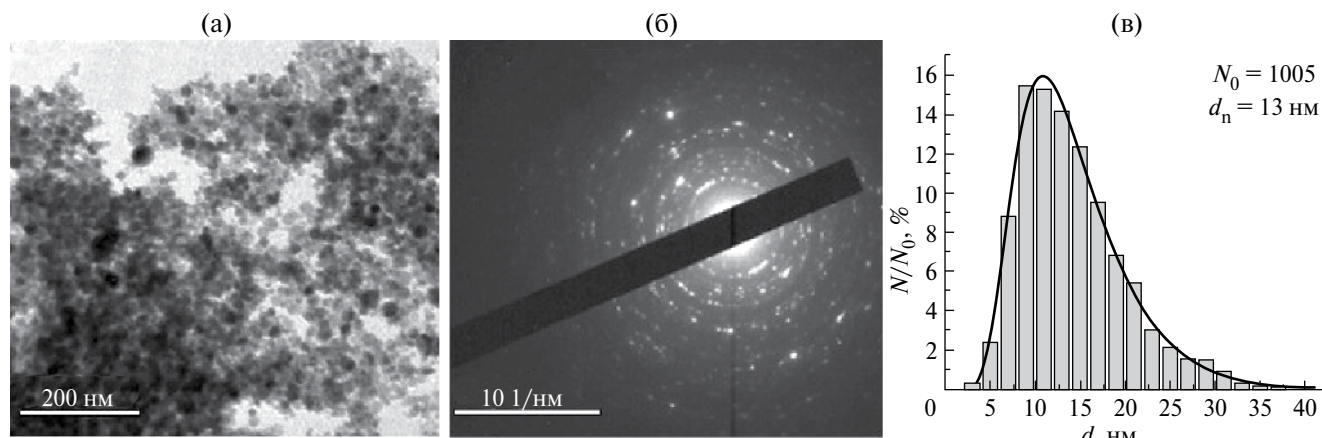


Рис. 2. ПЭМ-изображения МНЧ суспензии (а) и микродифракционная картина, подтверждающая фазовый состав: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (б). Распределение по размерам МНЧ, построенное на основе данных ПЭМ по изображениям 1005 частиц (в)

При этом возможен как вариант самостабилизации, обеспечиваемой положительным дзета-потенциалом за счет диссоциации следовых количеств нитратов, образующихся на поверхности частиц оксида при их конденсации в воздушной среде в условиях высоких температур, так и вариант с использованием электростатического стабилизатора — цитрата натрия, обеспечивающего отрицательное значение дзета-потенциала за счет адсорбции цитрат ионов на поверхности наночастиц в водной дисперсионной среде [9, 15, 19]. Использование цитрата является предпочтительным, поскольку в данном случае выше порог коагуляции суспензии электролитами [20].

Тем не менее стабилизирующего действия цитрата оказывается недостаточно для обеспечения устойчивости суспензии наночастиц маггемита в средах с высокой ионной силой, таких, как типичные питательные среды для клеточных культур. На рис. 3 представлены дифференциальные кривые унимодального распределения по размерам (ДКР) при введении суспензии наночастиц маггемита, стабилизированных цитратом, в воду и в питательную среду DMEM. В водной среде средний гидродинамический диаметр частиц в суспензии составляет 49 нм, дзета потенциал — 44.3 ± 6.4 мВ.

Здесь уместно остановиться на различии в величине среднего гидродинамического диаметра, определенного методом динамического рассеяния света (ДРС), и среднего диаметра, определенного по данным ПЭМ. Этот вопрос для суспензий наночастиц маггемита, синтезированных методами импульсного испарения, в частности ЛИМ, был подробно разобран в наших ранних работах [9, 15, 16]. Приведенные выше значения среднего диаметра: 13 нм (ПЭМ) и 49 нм (ДРС) относятся к разным типам усреднения выборки частиц по размерам. Значение 13 нм является среднечисловым (d_n) и соответствует усреднению диаметра в первой степени. В случае если распределение частиц по размерам

задано в виде гистограммы, среднечисловой диаметр рассчитывается по уравнению (1). Значение 49 нм (гидродинамический диаметр) является средним по интенсивности светорассеяния (d_{int}). Среднее по интенсивности, определяемое методом ДРС, соответствует усреднению коэффициента диффузии частиц, что эквивалентно усреднению диаметра частиц в шестой степени. Для распределения, заданного в виде гистограммы d_{int} рассчитывается по уравнению (2) [21].

$$d_n = \frac{\sum d_i N_i}{\sum N_i}, \tag{1}$$

$$d_{int} = \frac{\sum d_i^6 N_i}{\sum d_i^5 N_i}, \tag{2}$$

где d_i — средний диаметр частиц в отдельной фракции гистограммы распределения, N_i — число частиц в данной фракции.

Для сопоставления средних размеров частиц, определяемых разными методами, необходимо сначала привести средние значения к одному типу. Данные ПЭМ позволяют непосредственно воспользоваться уравнениями (1) и (2), поскольку диаметр и число частиц определяются из анализа микрофотографий. В методе ДРС на основании экспериментально измеряемой автокорреляционной функции рассчитывается средний по интенсивности диаметр и дисперсия его логнормального распределения [21]. На основании логнормального распределения по интенсивности могут быть также рассчитаны разные средние значения по выборке с использованием уравнений, подобных уравнениям (1) и (2), но записанные в интегральной форме. Опция пересчета средних по интенсивности в среднечисловые значения диаметра заложена в программном обеспечении прибора ДРС.

Если воспользоваться уравнениями (1) и (2) для данных ПЭМ и опцией пересчета в приборе ДРС, то для рассматриваемой суспензии получаются следующие результаты: $d_n = 13$ нм (ПЭМ), 32 нм (ДРС); $d_{int} = 43$ нм (ПЭМ), 49 нм (ДРС). Значения d_{int} , определенные разными методами, лучше сходятся между собой, чем значения d_n , хотя и в последнем случае отличия не очень существенны. Мы считаем, что предпочтительнее сопоставлять значения d_{int} , поскольку это экспериментально определяемая величина для ДРС, а для ПЭМ – величина, непосредственно рассчитываемая из фактической гистограммы (уравнение (2)). В то же время величина d_n , предоставляемая программным обеспечением прибора ДРС, рассчитывается в приближении логнормального распределения частиц по размерам, что не обязательно точно выполняется для конкретной суспензии и приводит к большому расхождению в величинах, определенных разными методами. Различия в величинах средних диаметров частиц, определенных методами ПЭМ и ДРС, выглядят вполне разумно, учитывая то, что на поверхности частиц, диспергированных в воде, имеется сольватная оболочка, эффективно увеличивающая их средний диаметр в суспензии. На основании представленного анализа можно заключить, что использованная суспензия в основном содержала индивидуальные дезагрегированные наночастицы магнетита.

Возвращаясь к рис. 3, отметим существенное увеличение среднего гидродинамического диаметра при введении стабилизированной цитратом суспензии магнетита в питательную среду DMEM. Средний гидродинамический диаметр частиц в суспензии в DMEM составил 1240 нм, дзета-потенциал в результате сжатия двойного электрического слоя (ДЭС) в среде с высокой ионной силой снизился до -16.3 ± 2.9 мВ. В этих условиях суспензия магнетита быстро коагулировала с выпадением хлопьевидного осадка.

Приблизительно похожая картина наблюдалась при использовании индивидуального электростерического стабилизатора на основе олигомерного полиметакрилата аммония. В результате тестирования различных методических подходов было установлено, что желаемый результат достигается при поэтапном комбинировании электростатического и электростерического стабилизаторов. Первоначально готовится и дезагрегируется суспензия магнетита, стабилизированная цитратом натрия (5 мМ), затем в нее вводится электростерический стабилизатор – полиметакрилат аммония (0.5%). Особенностью методики является необходимость выдержки полученной суспензии для обеспечения эффективной стабилизации при введении в питательную среду DMEM.

На рис. 4 представлена зависимость среднего гидродинамического диаметра частиц/агрегатов при введении в питательную среду DMEM суспензии магнетита, стабилизированной по двухстадийной

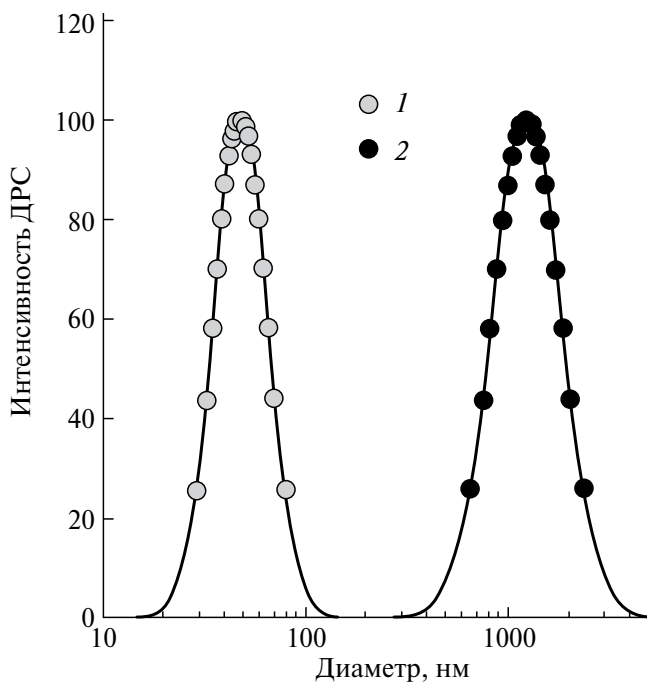


Рис. 3. Распределение частиц/агрегатов в суспензии наночастиц магнетита, стабилизированных цитратом натрия. 1 – в воде; 2 – в питательной среде DMEM.

методике, от времени предварительной выдержки суспензии при комнатной температуре.

Видно, что свежеприготовленная суспензия, стабилизированная по двухстадийной методике, не обеспечивает эффективной стабилизации в питательной среде – размер агрегатов в зависимости от концентрации полиметакрилата аммония составляет 400–1200 нм. В процессе предварительной выдержки суспензии перед введением в питательную среду стабилизирующее действие усиливается и средний диаметр агрегатов уменьшается. Средний гидродинамический диаметр агрегатов также уменьшается при повышении концентрации полиметакрилата аммония в суспензии. При достаточно длительной выдержке в течение 4 недель базовой суспензии магнетита с концентрацией полиметакрилата аммония 0.5% при ее введении в питательную среду DMEM гидродинамический диаметр частиц/агрегатов составил 75 нм, что близко к значениям в воде. Дзета-потенциал при этом составлял -16.4 ± 3.0 мВ.

Это значение совпадает с приведенным выше значением дзета-потенциала суспензии наночастиц магнетита, стабилизированных цитратом и введенных в питательную среду DMEM. Данное совпадение вполне ожидаемо, поскольку среда с высокой ионной силой одинаковым образом действует на ДЭС. Однако, несмотря на потерю электростатической стабилизации, суспензия не агрегировала. То есть ее стабильность обеспечивал стерический фактор.

На данном этапе механизм процессов, протекающих при двухстадийной стабилизации базовой

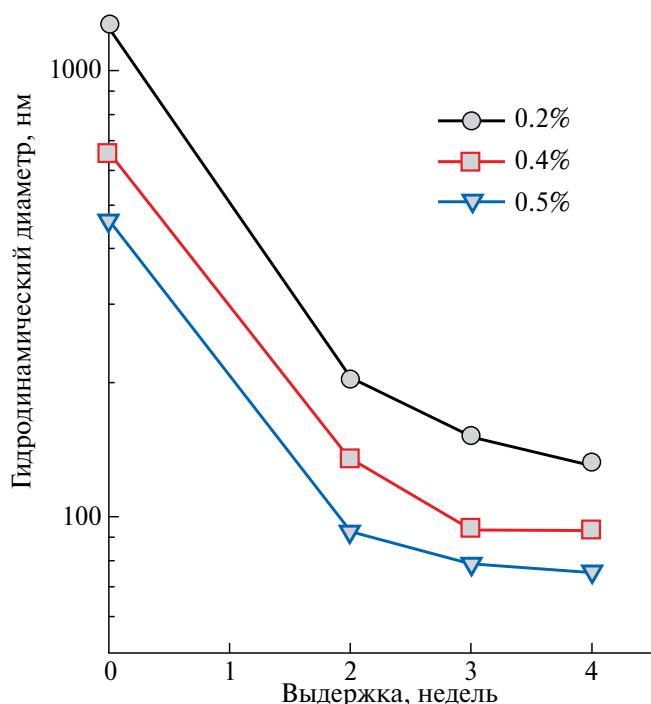


Рис. 4. Средний гидродинамический диаметр частиц/агрегатов при введении в питательную среду DMEM суспензии наночастиц маггемита, стабилизированной цитратом натрия и полиметакрилатом аммония по двухстадийной методике, в зависимости от времени предварительной выдержки суспензии при 25°C.

суспензии маггемита остается неясным и требует отдельного более детального исследования. Однако некоторые предположения могут быть высказаны.

При использовании цитрата в качестве электростатического стабилизатора водной суспензии частиц оксидов металлов ДЭС формируется по механизму специфической адсорбции. Потенциалобразующими являются трехосновные цитрат-ионы, которые адсорбируются на поверхности оксида за счет образования комплексной хелатной соли с ионами металла в составе кристаллической решетки. Карбоксильные группы, не участвующие в комплексообразовании с поверхностью оксида, обеспечивают отрицательный заряд поверхности. Противоионами выступают катионы натрия. В водной среде дзета-потенциал по абсолютной величине принимает высокие значения свыше -40 мВ, что эффективно стабилизирует суспензию. Полиметакрилат аммония также является полиосновной кислотой, которая также способна к комплексообразованию с ионами металла на поверхности оксида. Полиметакрилат также способен обеспечивать отрицательный заряд поверхности за счет свободных карбоксилатных групп, не занятых в комплексообразовании. То есть с химической точки зрения цитрат и полиметакрилат являются аналогами. С этой точки зрения вполне резонно предположить, что строение ДЭС в обоих этих случаях

будет аналогично. Соответственно, это относится и к процессу сжатия ДЭС в среде с высокой ионной силой. Как мы предполагаем, при добавлении полиметакрилата аммония к суспензии, стабилизированной цитратом натрия, происходит обменная реакция на поверхности, в ходе которой низкомолекулярные ионы цитрата замещаются полиионами метакрилата. Возможно, что в этом процессе играет роль наличие большего числа алкильных гидрофобных групп в составе полиметакрилата, что и обуславливает ее замедленную кинетику. Наличие неполярных групп в составе полимерного адсорбционного слоя на поверхности обеспечивает стерическую стабилизацию суспензии в дополнение к электростатической, что обеспечивает ее агрегативную устойчивость в средах с высокой ионной силой. Не вполне пока понятно, почему стабилизация носит именно постадийный характер. Это должно стать предметом отдельных исследований.

В целом, двухстадийная методика позволила обеспечить требуемый уровень стабильности при введении базовой суспензии в питательную среду для выращивания клеточных структур. В практическом плане длительная выдержка при комнатной температуре крайне неудобна. Было установлено, что необходимое время выдержки существенно снижается при повышении температуры. Так, для обеспечения гидродинамического диаметра частиц/агрегатов в питательной среде на уровне 70 нм достаточно было прогреть базовую суспензию, приготовленную по двухстадийной методике, в течение 1 часа при температуре 90°C. Такая резкая зависимость от температуры косвенно указывает на то, что процессы, происходящие на стадии выдержки базовой суспензии, носят активационный характер, характерный для протекания химической реакции.

На рис. 5 приведена фотография (оптическая микроскопия) МСК на адгезивной поверхности чашек Петри в невысушенном состоянии.

Для понимания применимости имеющихся методик оценки шероховатости поверхности было проведено сравнительное исследование стандартного покровного стекла типа Corning glass и культурального пластика рабочей поверхности чашки Петри того же типа, что использовался в биоэксперименте для различных длин сканирования. Установлено, что параметры шероховатости культурального пластика сильно отличаются от параметров покровного стекла, а именно, для пластика шероховатость выше на порядок и более, в зависимости от зоны сканирования: для стекла — примерно 0.8 нм, а для пластика 7–9 нм.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) использовалась для анализа шероховатости биологических образцов (рис. 6). Прежде всего, видно, что по высоте наибольшая шероховатость наблюдается в случае МСК, экспонированных в присутствии суспензии в концентрации 256 мкг/см².

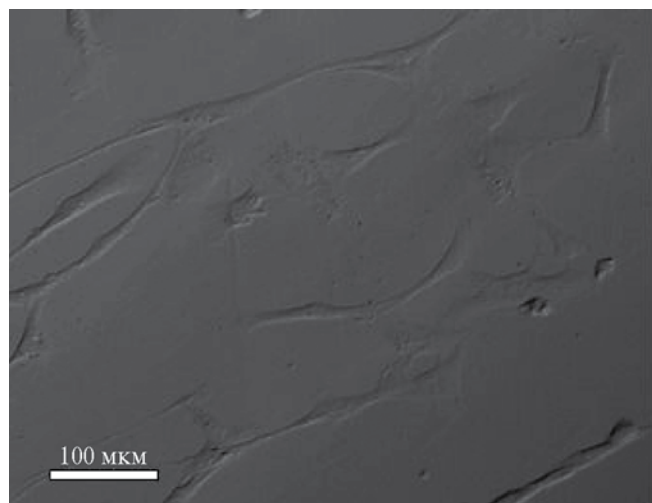


Рис. 5. Общий вид культуры мезенхимальных стромальных клеток человека на культуральном пластике.

Вероятная схема взаимодействия МНЧ и МСК может быть предложена на основе данных АСМ и профилометрии. Последний метод позволяет оценивать

шероховатость несколько менее точно, но на большей площади сканирования. АСМ указывает на гораздо более высокие величины (примерно на порядок) шероховатости после отмыwania суспензии с поверхности культурального пластика, чем чистой чашки Петри.

Наименьшая величина шероховатости характерна для МСК, выращенных в присутствии малого количества МНЧ, тогда как наибольшая шероховатость соответствует случаю, когда клетки были выращены при большой концентрации наночастиц. Вероятно, шероховатость поверхности тем больше, чем выше уровень адгезии МНЧ клетками, зависящий от концентрации частиц в ростовой среде. Чтобы проверить справедливость данного предположения следует дополнительно провести химический анализ, ПЭМ или магнитные измерения супернатантов.

Как следует из рис. 5, МСК клетки сильно вытянуты в длину и имеют размеры примерно 100×10 мкм. То есть вся зона АСМ скана примерно соответствует поверхности одной клетки, а наблюдаемый рельеф — это отдельные частицы в форме агломератов. Из этих данных следует, что частицы в основном находятся

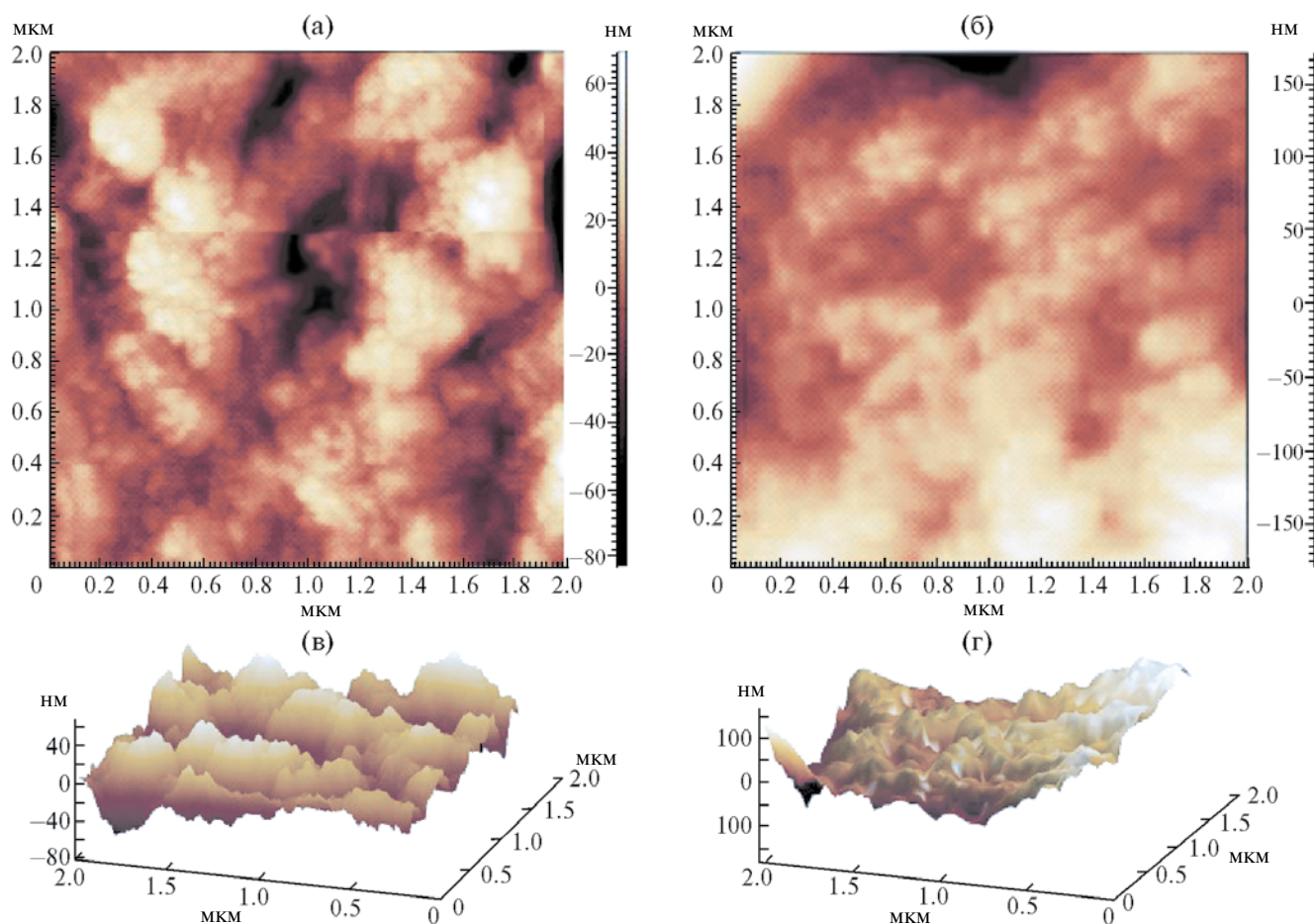


Рис. 6. Культура клеток МСК с суспензией МНЧ в концентрации 1 мкг/см^2 после отмыwania (а, в), культура клеток МСК с суспензией МНЧ в концентрации 256 мкг/см^2 после отмыwania (б, г). Верхний ряд — в 2D, а нижний ряд — в 3D-представлении. Все единицы по горизонтальным осям — мкм.

на поверхности клеток в виде агломератов, но при этом агломераты оказываются прочно связаны с клеткой, поскольку они не смываются с ее поверхности. Резюмируя часть структурных исследований, можно отметить, что, хотя и косвенно, экспериментальные данные подтверждают предположение о наличии взаимодействия между МНЧ и МСК, в результате которого, по крайней мере, часть МНЧ закрепляется клеточной культурой.

На рис. 7 приведены типичные электронные микрофотографии МСК-содержащих МНЧ. В первую очередь следует отметить, что во всех случаях в образце, прошедшем процедуру отмывки, наблюдается большое количество МНЧ. Хотя по 2D-данным ПЭМ для изображений клеток, содержащих МНЧ (рис. 6а, б), невозможно установить интернализированы или нет оставшиеся после процесса отмывания наночастицы, полученные результаты не исключают такую возможность. Ранее было отмечено, что синтезированная в данной работе суспензия ЛИМ МНЧ достаточно похожа на суспензию, использованную в исследовании [9], где агрегаты МНЧ отмечались внутри эндосом, контурировали гидролитические везикулы/секреторные гранулы и внешнюю мембрану митохондрий, и лишь единичные включения свободно располагались в цитоплазме клеток. Так или иначе, данные ПЭМ (без окраски органелл) подтверждают тот факт, что МСК после добавления МНЧ в ростовую среду интенсивно их аккумулируют, что, в свою очередь, указывает на некую форму взаимодействия между МНЧ и МСК.

На рис. 7в приведен пример типичного скопления МНЧ – это агломерат МНЧ. Поскольку, как было отмечено выше, суспензия содержала индивидуальные частицы и ее стабильность в питательной среде специально обеспечивалась и контролировалась, то можно предположить, что агломерат наночастиц сформировался в процессе высушивания. Понятно, что стабильность суспензии не является абсолютной, а отвечает значению ионной силы в питательной среде. При высушивании суспензии вода удаляется, и концентрация солей растет. В соответствии с общими коллоидно-химическими принципами при определенной их концентрации должен быть превышен порог коагуляции. Соответственно, суспензия теряет стабильность и агломерирует. По данным ПЭМ можно оценить размер агломерата, который составляет не менее 500 микрон, включает не менее 2000 частиц, и указать на то, что подобные агломераты, хотя и единичные, появляются в поле зрения не реже, чем один на 50 мкм^2 .

В целом, результаты атомно-силовой микроскопии, профилометрии и электронной просвечивающей микроскопии позволяют предложить схему взаимодействия МНЧ и МСК, представленную на рис. 8.

По-видимому, суспензия МНЧ, изначально стабильная в питательной среде, теряет свою

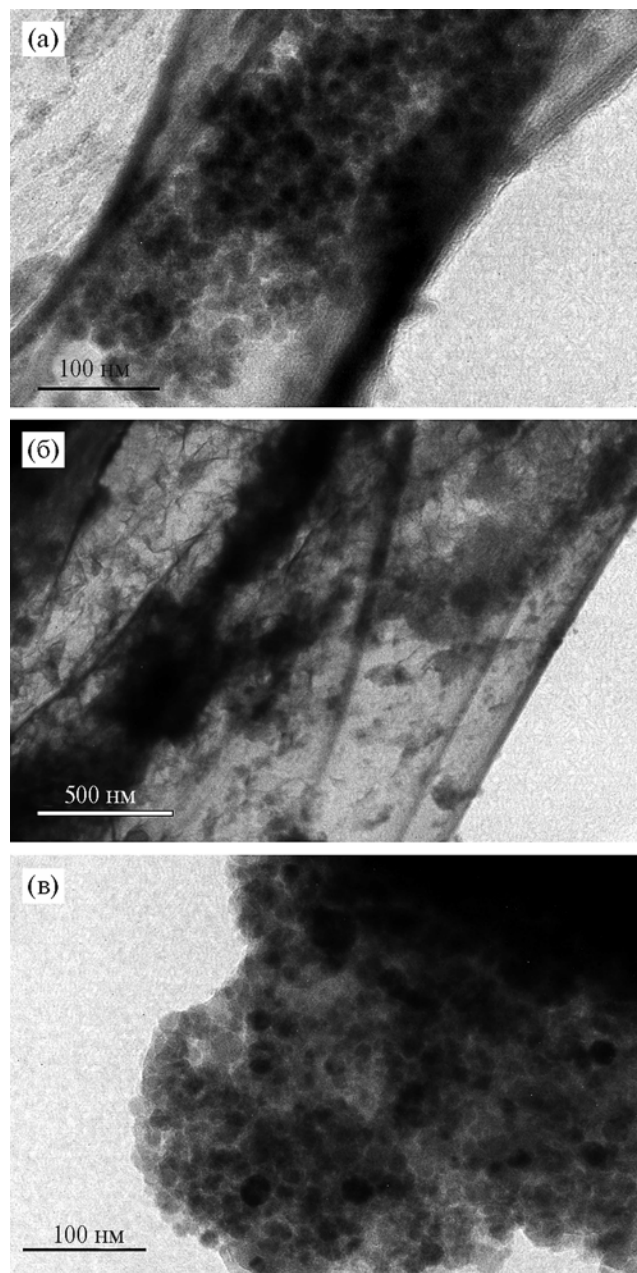


Рис. 7. ПЭМ-изображение биологического образца, представляющего собой смыв этиловым спиртом культуры клеток МСК с суспензией МНЧ в концентрации 256 мкг/см^2 : части (а) и (б) показывают различные области, где МНЧ находятся либо внутри, либо на поверхности МСК клеток. В случае типичной области, показанной на фотографии (в) – это агломерат МНЧ, сформированный в питательной среде в ходе того же самого исследования.

устойчивость вблизи клеточной мембраны МСК. Причиной может быть взаимодействие МНЧ с двойным электрическим слоем на поверхности клеточной мембраны. Известно, что клеточная мембрана характеризуется отрицательным значением мембранного потенциала около -90 мВ , обусловленного полиэлектролитами, содержащимися в цитоплазме кортексе

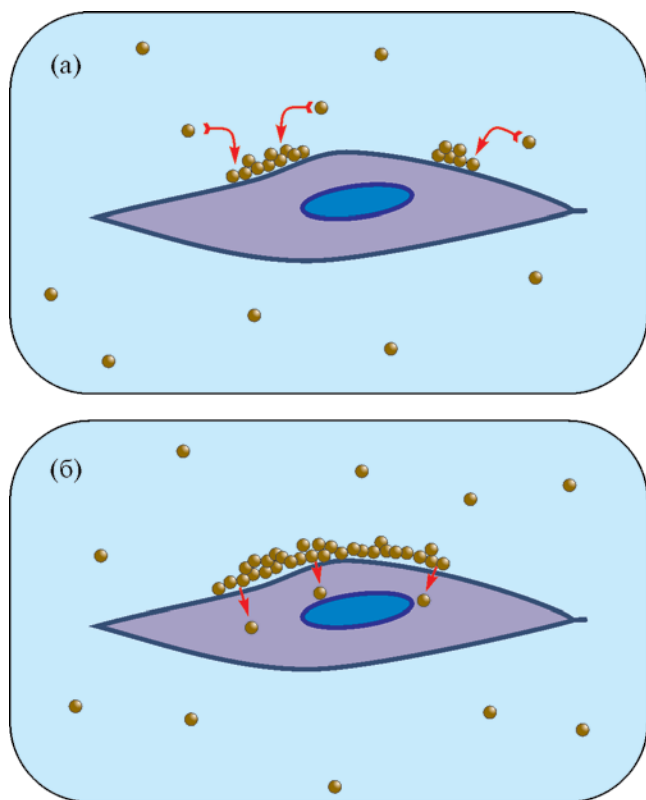


Рис. 8. Схема, иллюстрирующая процесс взаимодействия МНЧ, добавленных в питательную среду, и клеточной культуры. (а) коагуляция МНЧ вблизи клеточной мембраны; (б) интернализация адсорбированных МНЧ сквозь мембрану клетки в цитоплазму.

клетки. Этот потенциал компенсируют противоионы – физиологические катионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , формирующие внешнюю обкладку ДЭС на поверхности мембраны. Поскольку дзета-потенциал МНЧ отрицателен, они могут электростатически взаимодействовать с катионами ДЭС и встраиваться в структуру мембраны. В условиях повышенной ионной силы МНЧ теряют агрегативную устойчивость и агрегируют, подобно тому, как это происходит при высушивании суспензии МНЧ (рис. 7в). Схематично это показано на рис. 8а.

Образовавшиеся на мембране агрегаты МНЧ достаточно прочно связаны с ней. На это указывает тот факт, что они не удаляются с поверхности клеток в процессе отмывки. Вероятно, что адсорбция агрегатов МНЧ является специфической и обусловлена взаимодействием химической природы, в частности, водородными связями. На настоящем этапе невозможно сказать что-либо определенное о механизме этого взаимодействия. В то же время наличие специфического взаимодействия МНЧ с мембраной клетки может приводить к их миграции сквозь мембрану и интернализации в цитоплазму клетки, как показано на рис. 8б.

Магнитные измерения биологических образцов требовали особой аккуратности ввиду слабости

магнитных сигналов. Для того чтобы исключить влияние поликарбонатной капсулы на результаты магнитных измерений, было проведено дополнительное исследование ее магнитных свойств (рис. 9а). Видно, что капсула изготовлена из диамагнитного материала, характеризующегося малой величиной магнитной восприимчивости и линейной зависимостью магнитного момента материала капсулы от величины приложенного магнитного поля при отрицательном наклоне прямой $m(H)$. Полученное значение $R^2 = 0.9999$ позволяет говорить о высокой точности получаемых результатов. На рис. 9б представлена калибровочная кривая для МНЧ высушенной суспензии, которая может быть использована для определения предела количественной оценки степени закрепления наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ культурами мезенхимальных стромальных клеток человека при измерении биологических образцов. При известной массе образца до и после высушивания и известном из биологических экспериментов количестве МСК в единице объема по данным магнитных экспериментов с помощью калибровочной кривой можно рассчитать среднее количество МНЧ, приходящееся на одну клетку.

Поскольку экспериментально полученные данные аппроксимируются линейной зависимостью, можно принять, что нижняя граница определения количества наночастиц достаточно приближена к пределу, который определяется систематической погрешностью измерительного метода. Хотя теоретически использованный в данном исследовании СКВИД магнитометр позволяет измерять магнитные моменты до 10^{-8} едм, в используемых на практике режимах измерений этот предел ограничен величиной 10^{-7} едм. При этом следует иметь ввиду, что источником магнитного сигнала является ансамбль магнитных наночастиц, которому свойственна определенная дисперсность. При уменьшении массы ансамбля могут меняться и параметры дисперсности, т.е. распределение магнитных частиц по размерам, т.к. идет уменьшение статистической выборки. Для наночастиц оксидов железа, полученных тем же методом, в тех же условиях и на том же оборудовании, ранее было проведено специальное исследование, связанное с изменением величины магнитного момента отдельной наночастицы в зависимости от ее размера [15]. Кроме того, магнитные измерения реальных биообразцов (как в высушенном состоянии, так и не обезвоженных) сопряжено с дополнительными трудностями, вызванными как биологически обусловленными [9], так и случайными причинами неоднородного распределения МНЧ в композите. Поэтому в результате всестороннего анализа экспериментальных данных было принято, что предельным значением, которое достоверно можно анализировать в биологических образцах данного типа с наночастицами данного типа, является величина

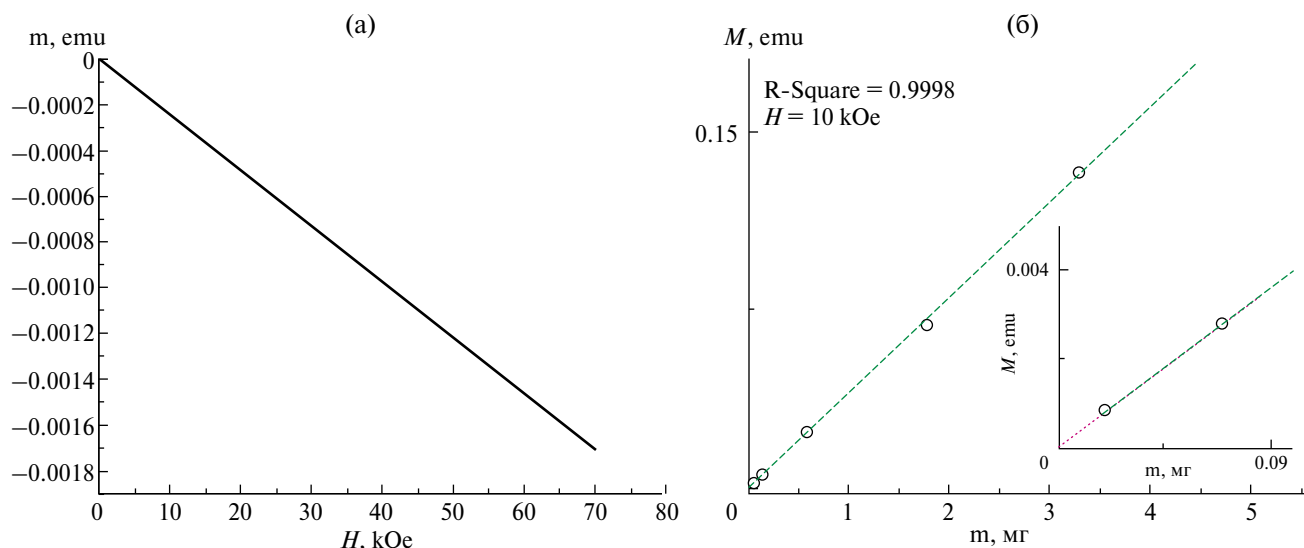


Рис. 9. Кривая намагничивания поликарбонатной капсулы (а). Зависимость величины намагниченности ансамбля наночастиц маггемита от массы образца высушенной суспензии с начальной концентрацией МНЧ 4.24 масс. %. На вставке показаны экспериментальные данные измерения образцов с величинами магнитного момента менее 0.004 emu, стрелками указаны нижние пределы возможной количественной оценки содержания МНЧ (б). Все измерения проведены при 300 К.

примерно 0.005 мг, что соответствует магнитному моменту около $2 \cdot 10^{-4}$ emu.

Вопрос о предельной концентрации МНЧ в биологических образцах требует дополнительного анализа. В практике магнитных измерений часто приходится иметь дело с высушенными образцами, т.к. это упрощает их хранение и позволяет значительно уменьшить объем, т.е. повышает прецизионность магнитных измерений. Магнитные сигналы большинства биообразцов без введенных магнитных маркеров чрезвычайно малы [1, 16]. Однако процесс приготовления образца для магнитных измерений требует ряда манипуляций и измерений, поэтому погрешность измерения биообразцов с очень малыми концентрациями МНЧ связана не только с погрешностью магнитных измерений, но и с погрешностями других вовлеченных измерений и пробоподготовки.

По результатам магнитных измерений биологических образцов с МНЧ было установлено количество

магнитных наночастиц в исследованных образцах в зависимости от исходной концентрации МНЧ, использованной при культивировании МСК (табл. 1).

Сравнение свойств МСК, выращенных при 1 мкг/см^2 и 256 мкг/см^2 , очень показательно. Отношение заявленных концентраций в них составляет 1 : 256, но в конечных образцах это соотношение составило примерно 1 : 11 при одинаковом количестве МСК в каждом образце (отличие в 20 раз, учитывая погрешности измерений). Это может быть связано с ограниченностью адсорбционных центров на клеточной мембране, что приводит к насыщению адсорбционного слоя при определенной концентрации МНЧ, меньшей, чем 256 мкг/см^2 . Предположительно можно ожидать наличия изотермы адсорбции МНЧ на поверхности МСК, вид которой мог бы дать информацию о механизме протекающих процессов. Ввиду своей трудоемкости задача детального изучения адсорбции не ставилась в рамках настоящей

Таблица 1. Результаты определения количества МНЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в биообразцах различного типа

Концентрация МНЧ при получении биологических образцов, мкг/см ²	Масса образца для магнитных измерений, мг	Масса МНЧ в биологических образцах, мг	Содержание МНЧ в биологических образцах, %
0	4.38	0.004*	0.09*
1	6.19	0.131	2.10
256	10.93	2.510	22.90

* Значения в 3-м и 4-м столбцах первой строки для нулевой концентрации МНЧ – это экспериментальная погрешность случайных магнитных вкладов, включая погрешности в определении концентрации магнитных добавок и массы образцов. Ее удобно представить в виде эквивалентного количества МНЧ для оценки погрешностей.

работы. Выяснение данного механизма будет предметом последующих исследований.

Полученные в настоящей работе результаты могут быть полезны как для сравнительного анализа ранее опубликованных результатов [3, 9, 18], так и для дальнейших исследований в области регенеративной медицины (магнитоактивные микросистемы-имплантаты биологических тканей на основе феррогелей) и магнитного биодетектирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами оптической микроскопии, просвечивающей электронной и зондовой микроскопии, а также с помощью магнитных измерений исследованы партии образцов культуры костномозговых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, выращенных в питательной среде, содержащей стабилизированные наночастицы маггемита $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Показано, что путем двухстадийной стабилизации последовательно цитратом натрия и полиметакрилатом аммония можно получить суспензию МНЧ, устойчивую в питательной среде. Установлено, что предельным значением, которое достоверно можно обнаружить в биологическом образце рассматриваемого типа с наночастицами данного типа является величина около 0.005 мг. Электронные микрофотографии (ПЭМ) показывают, что частицы маггемита связываются с МСК в виде агломератов. Исследования методом атомно-силовой микроскопии показали, что агломераты, с большой степенью вероятности, расположены на поверхности клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства здравоохранения РФ «Магнитоактивные микросистемы-имплантаты биологических тканей на основе феррогелей» (№ 121032300335-1) и программы «Приоритет-2030» Уральского федерального университета.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.В. Бекетова и А.Н. Горьковенко за сотрудничество.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pankhurst Q.A., Connolly A.J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // *J. Phys. D.* 2003. V. 36. № 13. P. R167. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/13/201>
2. Фролов Г.И., Бачина О.И., Завьялова М.М., Равочкин С.И. Магнитные свойства наночастиц и 3d-металлов // *Журнал Технической Физики.* 2008. Т. 78. № 8. С. 101–106
3. Курляндская Г.В., Сафронов А.П., Щербинин С.В., Бекетов И.В., Бляхман Ф.А., Макарова Э.Б., Корч М.А., Свалов А.В. Магнитные наночастицы, полученные электрофизическими методами: фокус на биомедицинские приложения // *Физика твердого тела.* 2021. Т. 63. № 9. С. 1290–1304. <https://doi.org/10.21883/FTT.2021.09.51255.17H>
4. Камзин А.С. Мессбауэровские исследования магнитных наночастиц Fe и Fe_3O_4 для гипертермических применений // *Физика тв. тела.* 2016. Т. 58. № 3. С. 519–525.
5. Geilich B.M., Gelfat I., Sridhar S., van de Ven A.L., Webster T.J. Superparamagnetic iron oxide-encapsulating polymersome nanocarriers for biofilm eradication // *Biomaterials.* 2017. V. 119. P. 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.12.011>
6. Khawja Ansari S.A.M., Ficiara E., Ruffinatti F.A., Stura I., Argenziano M., Abollino O., Cavalli R., Guiot C., D'Agata F. Magnetic Iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and functionalization for biomedical applications in the central nervous system // *Materials.* 2019. V. 12. № 3. P. 465. <https://doi.org/10.3390/ma12030465>
7. Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing // *N. Engl. J. Med.* 1986. V. 315, P. 1650–1659. <https://doi.org/10.1056/nejm198612253152606>
8. Grossman J.H., McNeil S.E. Nanotechnology in Cancer Medicine // *Phys. Today.* 2012. V. 65. № 8. P. 38–42. <https://doi.org/10.1063/PT.3.1678>
9. Kurlyandskaya G.V., Litvinova L.S., Safronov A.P., Schupletsova V.V., Tyukova I.S., Khazjakhmatova O.G., Slepchenko G.B., Yurova K.A., Cherempey E.G., Kulesh N.A., Andrade R., Beketov I.V., Khlusov I.A. Water-based suspensions of iron oxide nanoparticles with electrostatic or steric stabilization by chitosan: fabrication, characterization and biocompatibility // *Sensors.* 2017. V. 17. № 11. P. 2605. <https://doi.org/10.3390/s17112605>
10. Beketov I.V., Safronov A.P., Medvedev A.I., Alonso J., Kurlyandskaya G.V., Bhagat S.M. Iron oxide nanoparticles fabricated by electric explosion of wire: focus on magnetic nanofluids // *AIP Adv.* 2012. V. 2. P. 022154. <https://doi.org/10.1063/1.4730405>
11. Kotov Yu.A. Electric explosion of wires as a method for preparation of nanopowders // *J. Nanopart. Res.* 2003. V. 5. № 5. P. 539–550. <https://doi.org/10.1023/B:NANO.0000006069.45073.0b>

12. *Melnikov G.Yu., Lepalovskij V.N., Svalov A.V., Safronov A.P., Kurlyandskaya G.V.* Magnetoimpedance thin film sensor for detecting of stray fields of magnetic particles in blood vessel // *Sensors*. 2021. V. 21. P. 3621. <https://doi.org/10.3390/s21113621>
13. *Prilepskii A.Y., Fakhardo A.F., Drozdov A.S., Vinogradov V.V., Dudanov I.P., Shtil A.A., Bel'tyukov P.P., Shibeiko A.M., Koltsova E.M., Nechipurenko D.Y., Vinogradov V.V.* Urokinase-conjugated magnetite nanoparticles as a promising drug delivery system for targeted thrombolysis: synthesis and preclinical evaluation // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. V. 10. P. 36764–36775. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14790>
14. *Graham L., Orenstein J.M.* Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 2439–2450. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.304>
15. *Kulesh N.A., Novoselova I.P., Safronov A.P., Beketov I.V., Samatov O.M., Kurlyandskaya G.V., Morozova M., Denisova T.P.* Total reflection x-ray fluorescence spectroscopy as a tool for evaluation of iron concentration in ferrofluids and yeast samples // *J. Magn. Magn. Mater.* 2016. V. 415. P. 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.01.095>
16. *Safronov A.P., Beketov I.V., Komogortsev S.V., Kurlyandskaya G.V., Medvedev A.I., Leiman D.V., Larranaga A., Bhagat S.M.* Spherical magnetic nanoparticles fabricated by laser target evaporation // *AIP Adv.* 2013. V. 3. P. 052135. <https://doi.org/10.1063/1.4808368>
17. *Zborowski M., Chalmers J.* *Magnetic Cell Separation* (Elsevier, 2008), P. 486.
18. *Novoselova I.P., Safronov A.P., Samatov O.M., Beketov I.V., Medvedev A.I., Kurlyandskaya G.V.* Water based suspensions of iron oxide obtained by laser target evaporation for biomedical applications // *J. Magn. Magn. Mater.* 2016. V. 415. P. 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.01.093>
19. *Kurlyandskaya G.V., Novoselova Iu.P., Schupletsova V.V., Andrade R., Dunec N.A., Litvinova L.S., Safronov A.P., Yurova K.A., Kulesh N.A., Dzyuman A.N., Khlusov I.A.* Nanoparticles for magnetic biosensing systems // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017. V. 431. P. 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.07.056>
20. *Safronov A.P., Beketov I.V., Tyukova I.S., Medvedev A.I., Samatov O.M., Murzakaev A.M.* Magnetic nanoparticles for biophysical applications synthesized by high-power physical dispersion // *J. Magn. Magn. Mater.* 2015. V. 383. P. 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.11.016>
21. *Tscharnuter W.W.* Photon correlation spectroscopy in particle sizing // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Ed. by R. A. Meyers (JohnWiley & Sons Ltd., 2001). P. 5469. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1512>

DETERMINATION OF THE LIMITS FOR QUANTIFICATION OF THE DEGREE OF INTERNALIZATION OF γ -Fe₂O₃ NANOPARTICLES BY CULTURES OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

E. A. Burban, F. A. Fadeyev, A. P. Safronov, F. A. Blyakhman, T. V. Terziyan, D. S. Neznakhin, A. A. Yushkov, G. V. Kurlyandskaya

A culture of human bone marrow mesenchymal stromal cells (MSCs) was investigated in the present work. Cell culture was grown as a monolayer in a nutrient medium into which a stabilized aqueous suspension of magnetic nanoparticles (MNPs) of maghemite (γ -Fe₂O₃) were added. MNPs were synthesized by the electrophysical method of laser target evaporation. A method has been proposed for stabilizing a suspension in a nutrient medium with high ionic strength. A qualitative assessment of the possibility of internalization (either by fixing on the cell membrane or by penetrating into the cell space) of MNPs with human MSCs was carried out using optical, scanning and transmission electron microscopy and SQUID magnetometry. Comparative analysis of the structure and magnetic properties was made, and assumptions about the features of MNP internalization in this system were provided. It has been established that the limiting value for MNPs that can reliably be analyzed in a biological sample of the type under consideration with nanoparticles of this type is of about 0.005 mg. It was found that in the considered range of initial concentrations of magnetic nanoparticles in biological samples based on human MSCs, the level of accumulation of magnetic nanoparticles in cell cultures depends on their concentration.

Keywords: laser target evaporation technique, magnetic nanoparticles, maghemite, stabilized aqueous suspensions, human mesenchymal stromal cells, transmission electron microscopy, magnetic measurements