

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РАЗРЯДА ПРИ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ КАВИТАЦИИ

В.Н. Никифоров<sup>1</sup>, Н.А. Бульчев<sup>2</sup>, М.А. Казарян<sup>2</sup>, В.В. Прядун<sup>1</sup>, С.Н. Шевченко<sup>1</sup>,  
В.Г. Якунин<sup>1</sup>, В.Ю. Тимошенко<sup>1,3</sup>, А.Б. Быченко<sup>4</sup>, А.В. Иванов<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
физический факультет, Москва

<sup>2</sup> Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

<sup>4</sup> Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов  
им. М.П. Чумакова РАМН, пос. Московский,

<sup>5</sup> Российский онкологический научный центр им Н.Н.Блохина МЗ РФ, Москва

Методом акустоплазменного разряда были получены наночастицы оксидов различных металлов – вольфрама, меди, железа, цинка – и показано, что наличие ультразвуковой кавитации при синтезе наночастиц существенно влияет на их размерные и физические характеристики. Размеры наночастиц определялись методом электронной микроскопии и лазерной корреляционной спектроскопии, результаты которых оказались в хорошем соответствии. На примере оксида вольфрама установлено различие спектров фотолюминесценции наночастиц, полученных в отсутствие и в присутствии ультразвуковой кавитации. Проведенные исследования полученных наночастиц в экспериментах *in vitro* на различных клеточных линиях не выявили их цитотоксичности вплоть до концентраций 0,2 мг/мл и времени экспозиции 7 сут, что указывает на хорошие перспективы их биомедицинских применений в качестве средств диагностики и магнитной гипертермии.

Ключевые слова: наночастицы, оксиды металлов, плазма, ультразвуковая кавитация, цитотоксичность

### Введение

Задача получения наноматериалов с контролируемыми свойствами имеет практическое приложение. Наночастицы оксидов 3d металлов, в частности, оксиды железа, находят широкое применение в биологии и медицине. Так, наномагнетит применяется как агент магнитной гипертермии в онкологии [1, 2]. Интерес к данному методу терапии возрос в связи с отсутствием резистентности. Применение гипертермии вкупе с другими методами, химио-

лучевой терапией, позволяет уменьшить дозы препаратов и дозы облучения.

Получение наноразмерных материалов с контролируемыми свойствами, наряду с традиционными химическими методами синтеза, возможно с помощью физических методов, таких как электрические разряды и ультразвуковая кавитация [3–5]. Одним из перспективных путей получения наноразмерных материалов, в том числе порошков оксидов металлов, является комбинированное воздействие на жидкую среду ультразвуковых колебаний высокой

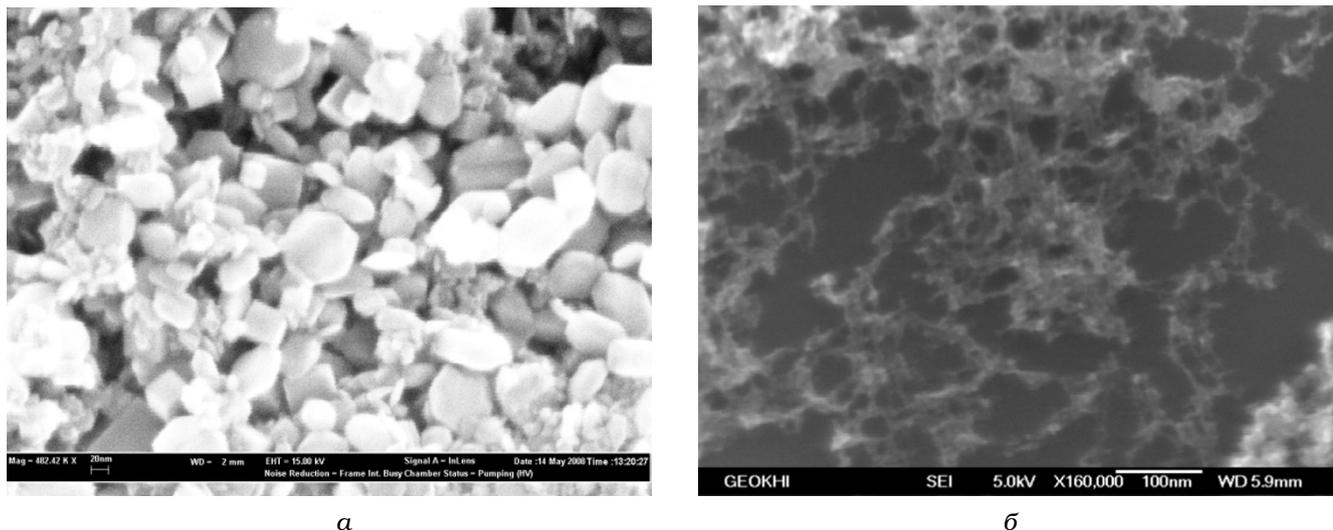


Рис. 1. Фотографии наночастиц оксида вольфрама (а) и оксида железа (б)

интенсивности и импульсных или стационарных электрических полей. Получаемый в результате в кавитирующей жидкой среде акустоплазменный разряд является новым и мало изученным физическим явлением. Данный метод имеет ряд преимуществ как метод получения наноматериалов – относительно узкое распределение по размерам частиц синтезируемого нанопорошка, специфический состав и свойства получаемых наноматериалов, высокую производительность [6–8].

### Результаты исследования: физические свойства

Проведенные ранее эксперименты позволили установить, что в интенсивном ультразвуковом поле в жидкости выше порога кавитации может существовать новая форма электрического разряда, характеризующаяся объемным свечением во всем пространстве между электродами и возрастающей вольт-амперной характеристикой, присущей аномальному тлеющему разряду в газе [6]. В таком разряде потенциально возможно осуществить новые химические реакции [7, 8]. При использовании металлических электродов для инициирования и поддержания такого акустоплазменного разряда в жидкой фазе образуются наночастицы оксида того металла, из которого изготовлены электроды [7].

Нами была исследована возможность направленного получения наночастиц различных материалов в жидкости с помощью акусто-

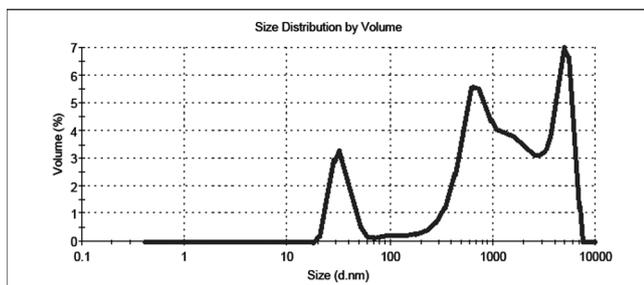
плазменного разряда. Эксперименты проводились в воде. Использование электродов из соответствующего материала (вольфрам, железо, медь, цинк) приводит к их окислению в кислородсодержащих жидкостях под действием плазменного разряда и к образованию суспензии наночастиц оксидов этих металлов в жидкой среде. При этом роль ультразвуковой кавитации заключается не только во влиянии на электрофизические характеристики самого разряда, но и в дроблении ассоциатов получаемых наночастиц и модификации их поверхности.

На рис. 1 представлены фотографии наночастиц оксида вольфрама и оксида железа, полученные методом сканирующей электронной микроскопии.

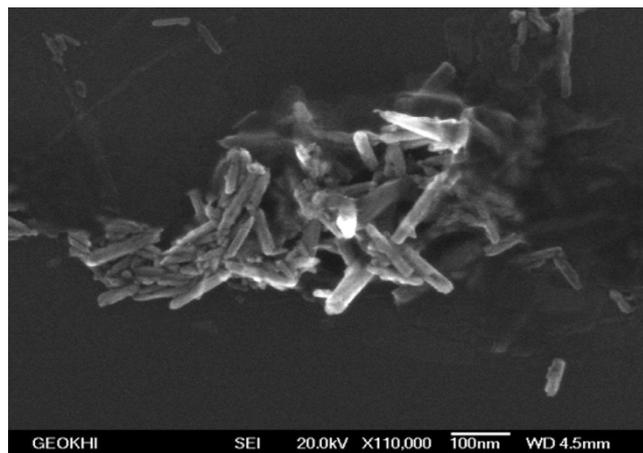
Исследование распределения по размерам наночастиц проводили методом динамического рассеяния света. Измерения осуществлялись на приборе Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd. При воздействии ультразвука частотой 44 кГц и интенсивностью 2 Вт/см<sup>2</sup> в режиме развитой кавитации (порог начала кавитации в воде около 0,05 Вт/см<sup>2</sup>) удавалось получать фракции наночастиц в узком интервале дисперсности.

Для исследования влияния кавитации на размер наночастиц были проведены эксперименты на оксиде цинка. Без кавитации были получены агломераты частиц с широким распределением по размерам (рис. 2а). Исследование исходных частиц методом электронной микроскопии показало, что, во-первых,

Results			
	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 385,3	Peak 1: 33,94	12,2	8,297
Pdl: 0,604	Peak 2: 1086	58,0	671,3
Intercept: 0,979	Peak 3: 4449	29,8	1097
Result quality Refer to quality report			



а



б

**Рис. 2.** а – распределение по размерам частиц оксида цинка, полученных в плазменном разряде без кавитации; б – фотографии агломератов частиц оксида цинка, полученные на сканирующем электронном микроскопе

при плазменном синтезе получают частицы палочковидной формы, а во-вторых, при агрегации они не укрупняются в размерах, а образуют составные агрегаты размером в несколько микрон (рис. 2б).

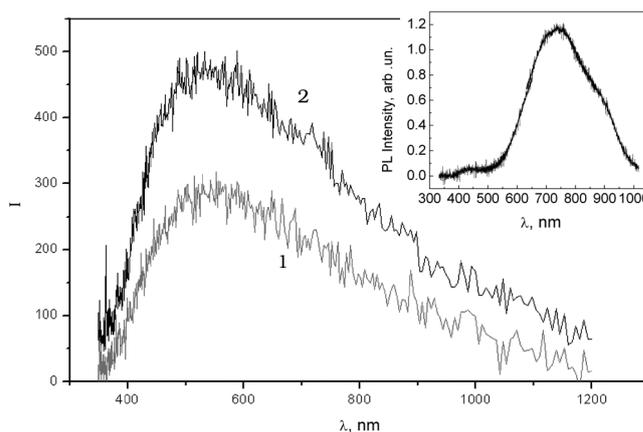
В режиме ультразвуковой кавитации агломераты частиц распадались на первичные частицы, и пик распределения по размерам значительно сужался, т.е. система становилась практически монодисперсной (рис. 3). Результаты исследований на сканирующем электронном микроскопе подтверждают факт получе-

ния стабильной монодисперсной системы наночастиц оксида цинка (рис. 3).

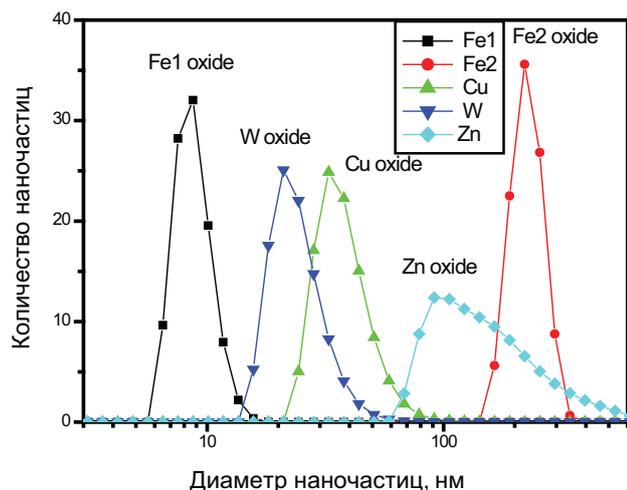
На рис. 4 приведены спектры фотолюминесценции (ФЛ) водных дисперсий оксида вольфрама, полученных в плазменном разряде в отсутствие и в присутствии ультразвуковой кавитации. Измерения проводились на спектрофлуориметре Cary Eclipse. Разницу в интенсивности люминесценции можно объяснить, по-видимому, разным химическим составом образующегося оксида вольфрама:  $WO_3$  без кавитации и  $WO_{2.3}$  в присутствии кавитации, то есть



**Рис. 3.** Фотография наночастиц оксида цинка, полученных на сканирующем электронном микроскопе



**Рис. 4.** Спектры фотолюминесценции наночастиц оксида вольфрама в плазменном разряде под действием ультразвука. Кривая 1 получена при интенсивности ультразвука ниже порога кавитации, Кривая 2 – выше порога кавитации. На вставке – спектр водной суспензии наночастиц  $ZnO$ . Возбуждение люминесценции на 337 нм при  $T=300$  К



**Рис. 5.** Распределение частиц по размерам по данным динамического рассеяния света

кавитация способствует большей делокализации электронов в молекулах и, следовательно, большей интенсивности свечения.

На вставке к рис. 4 показаны спектры ФЛ водной дисперсии наночастиц оксида цинка, полученных в плазменном разряде в присутствии ультразвуковой кавитации. Видно, что доминирующая полоса свечения соответствует длинам волн 600–900 нм, то есть лежит в красном и ближнем ИК-диапазоне спектра. Появление такой полосы можно объяснить вкладом излучательных переходов с участием глубоких уровней дефектов в запрещенной зоне ZnO (3,36 эВ или 370 нм для объемных кристаллических фаз). Наличие ФЛ в данном спектральном диапазоне позволяет в перспективе использовать данные наночастицы в качестве люминесцентных меток в диагностике злокачественных новообразований.

Особенностью метода динамического рассеяния света [9–11] является его чувствительность к форме наночастиц. В случае сферических наночастиц гидродинамический радиус, полученный по формуле Стокса–Эйнштейна, соответствует данным электронной микроскопии, в случае же отклонений от сферичности метод динамического рассеяния света дает значения в широком размерном диапазоне (см. рис. 2а и кривую Zn на рис. 5). Наночастицы оксида цинка имеют форму вытянутых цилиндров (рис. 3), и поэтому полученное методом динамического рассеяния све-

та распределение частиц по размерам не отражает реального.

На рис. 5 представлены кривые распределения частиц по размерам, рассчитанные по данным динамического рассеяния света после ультразвуковой обработки. Экспериментально установлено, что наночастицы с формой, близкой к сферической, имеют распределение по размерам, согласующееся с данным электронной микроскопии.

В представленных на рис. 5 данных распределения по размерам исследуемых наночастиц в их водных суспензиях максимум спектра динамического рассеяния света от исследуемых образцов находится в районе 9 нм для оксида железа при кавитации (Fe1), 220 нм для оксида железа без кавитации (Fe2), 20 нм для оксида вольфрама (W) и 37 нм для оксида меди (Cu). Для оксида цинка, из-за вытянутой стержнеобразной формы максимум 100 нм соответствует продольному размеру нанобъекта.

Согласно представленным данным видна хорошая корреляция результатов оценки размеров, полученных путем их прямого измерения при электронно-микроскопическом исследовании и с помощью спектров динамического рассеяния света.

На рис. 5 представлены спектры распределения по размерам частиц оксида железа двух типов, Fe1 и Fe2, отличающихся методом синтеза, в частности, интенсивностью воздействия ультразвука. Синтезированные частицы отличаются средними размерами в зависимости от интенсивности ультразвукового поля при синтезе: Fe2 соответствует интенсивности ультразвука ниже порога кавитации, Fe1 – выше порога кавитации, а именно 2 Вт/см<sup>2</sup>. Максимум спектра динамического рассеяния света от исследуемых образцов находится в районе 9 нм для оксида железа Fe1, 220 нм для оксида железа Fe2, что свидетельствует об определяющей роли интенсивности ультразвука при синтезе. Из полученных данных видно, что при воздействии ультразвука выше порога кавитации при синтезе происходит сдвиг максимума в спектре динамического рассеяния света в область 9 нм. Такое изменение размеров указывает на сильное взаимодействие наночастиц, обладающих магнитным диполь-дипольным взаимодействием.

## Исследование токсичности наночастиц

Токсикологическая безопасность наночастиц в настоящее время находится под повышенным контролем. Токсичность зависит от многих факторов, включая дозировку, химический состав поверхности, размер частиц и форма их распределений. При попадании наночастиц в кровоток возможен их транспорт и накопление в жизненно важных органах [12]. В связи с этим была проведена первичная оценка *in vitro* биосовместимости полученных наночастиц, в частности, исследовали их цитотоксичность.

Были взяты на исследование пять вариантов частиц: оксиды W, Cu, Zn, Fe1 и Fe2. Исходная концентрация частиц в растворах составляла 1 мг/мл. Частицы взбалтывали, разводили и добавляли к клеточным культурам в концентрации от 0,3 мг/мл до 1,6 мкг/мл. Для определения цитотоксичности были выбраны клеточные линии опухолей человека: PLC/PRF/5 – гепатокарцинома человека, МТ4 – Т-лимфоциты человека (лимфома) и диплоидные клетки – фибробласты человека – линия MRC-5. Диплоидные клетки использовали также в тестах на трансформацию и цитогенетический анализ.

Клетки рассевали в 96-луночные планшеты, помещали в CO<sub>2</sub>-термостат и культивировали при 37°C. Клеточные культуры вели на ростовой среде DMEM с 10 % эмбриональной сыворотки коров (ЭСК), а при добавлении нанопрепаратов среду меняли на поддерживающую DMEM с 2 % ЭСК. Концентрация клеток при определении цитотоксичности составляла для линии МТ4 100 тыс. клеток на мл, для линии MRC-5 – 100 тыс. клеток на см<sup>2</sup> монослоя, а для линии PLC/PRF/5 – 150 тыс. клеток на см<sup>2</sup> монослоя.

Учитывая очень низкую токсичность препаратов для клеток, проведение МТТ-теста [13] было затруднительно. Поэтому дифференциацию и подсчёт живых и мёртвых клеток проводили с помощью витального красителя – трипанового синего (0,2 %). Каждый день экспозиции клеток с наночастицами для анализа брали по 4 лунки, добавляли краситель и инкубировали при 37°C 20 мин. После этого проводили учёт витальности клеток. Для точности тестирование проводили исследования в камере Горяева. Только для препарата цинка была отмечена цитотоксичность до разведения

0,05 мг/мл. При этой концентрации и выше клетки всех трёх линий погибали. При максимальной возможной в эксперименте концентрации 0,3 мг/мл для наночастиц из других металлов (W, Cu, Fe1, Fe2) все клетки выживали в течение 7 сут (время инкубации). После этого дополнительно проводили исследование клеток, контактировавших с наночастицами. Обработанные (7 сут) максимальными дозами нанопрепаратов клетки после замены среды на ростовую начинали интенсивно делиться и по своим ростовым характеристикам ничем не отличались от контрольных. Такой результат был получен для всех трёх линий, в том числе и для диплоидных клеток MRC-5. Линия MRC-5 была использована также для выявления возможных цитотрансформирующих эффектов. Поэтому инкубация этих клеток с нанопрепаратами была увеличена до 14 сут. Ни за время эксперимента, ни при последующем культивировании очагов трансформации выявлено не было. Общее количество пассажей клеток MRC-5 обработанных наночастицами и контрольных было одинаковым.

Эксперимент показал чрезвычайно низкую цитотоксичность нанопрепаратов. При концентрации наночастиц 0,3 мг/мл цитопатических изменений выявлено не было. Только препарат цинка вызывал гибель клеток всех культур при концентрации 0,05 мг/мл и более. Срок наблюдения для определения цитотоксичности составлял 7 сут. Срок наблюдения для определения цитотрансформирующих проявлений составлял 14 сут.

Таким образом, в проведенном исследовании показана низкая цитотоксичность и не выявлены цитогенетические и трансформирующие эффекты исследованных наночастиц оксидов металлов на клетки *in vitro*.

## Заключение

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что комбинированное воздействие на жидкую среду электрического разряда и ультразвука с интенсивностью выше порога кавитации приводит к формированию однородных монодисперсных наночастиц оксидов W, Cu, Fe1 и Fe2, безопасных для использования в медико-биологических приложениях, кроме наночастиц оксида цинка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00029).

### Список литературы

1. Брусенцова Т.Н., Кузнецов В.Д., Никифоров В.Н. Синтез и исследование наночастиц ферритов для магнитной гипертермии. // Мед. физика, 2005, № 3, С. 58–68.
2. Никифоров В.Н., Брусенцов Н.А. Магнитная гипертермия в онкологии. // Мед. физика, 2007, № 2, С. 51–59.
3. Bang J. Ho, Suslick K.S. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. // *Advanced Materials*, 2010, **22**, No. 10, P. 1039–1059.
4. Ghomi H., Yousefi M., Shahabi N., Khoramabadi M. Ultrasonic-assisted spark plasma discharge for gold nanoparticles synthesis. // *Radiation Effects and Defects in Solids*, 2013, **168**, No. 11–12, P. 881–891.
5. Askarinejad A., Alavi M.A., Morsali A. Sonochemically assisted synthesis of ZnO nanoparticles: A novel direct method. // *Iran J. Chem. Chem. Eng.*, 2011, 30, No. 3, P. 75–81.
6. Бульчев Н.А., Казарян М.А., Гриднева Е.С. и соавт. Плазменный разряд с объемным свечением в жидкой фазе под действием ультразвука. // Краткие сообщения по физике, 2012, **39**, № 7, С. 39–49.
7. Бульчев Н.А., Казарян М.А., Чайков Л.Л. и соавт. Наноразмерные частицы оксидов металлов, полученные в плазменном разряде в жидкой фазе под действием ультразвуковой кавитации. // Краткие сообщения по физике, 2014, **41**, № 9, С. 33–39.
8. Klassen N., Krivko O., Kedrov V. et al. Laser and electric arc synthesis of nanocrystalline scintillators. // *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 2010, **57**, No. 3, P. 1377–1381.
9. Лопатин В.Н., Приезжев А.В., Апонасенко А.Д. и соавт. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. – М: Физматлит, 2004, 384 с.
10. Камминс Г., Пайк Э. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. – М: Мир, 1978, 500 с.
11. Никифоров В.Н., Виноградов С.Е., Иванов А.В. Лазерная корреляционная спектроскопия в измерении размеров вируса иммунодефицита человека. // *Наукоёмкие технологии*, 2011, **12**, № 6, С. 77–80.
12. Nikiforov V.N., Filinova E.Yu. Biomedical Application of Magnetic Nanoparticles. – Wiley-VCH Verlag GmbH, 2009, 393 pp.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. // *J. Immunol. Meth.*, 1983, **65**, No. 1–2, P. 55–63.

### INVESTIGATION OF THE PHYSICAL PROPERTIES AND CYTOTOXICITY OF NANOPARTICLES OF METAL OXIDES OBTAINED BY THE DISCHARGE AT ULTRASONIC CAVITATION

V.N. Nikiforov<sup>1</sup>, N.A. Bulychev<sup>2</sup>, M.A. Kazaryan<sup>2</sup>, V.V. Pryadun<sup>1</sup>, S.N. Shevchenko<sup>1</sup>, V.G. Yakunin<sup>1</sup>, V.Yu. Timoshenko<sup>1,3</sup>, A.B. Bychenko<sup>4</sup>, A.V. Ivanov<sup>5</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Dep. of Physics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> P.N. Lebedev Physical Institute of RAS, Moscow, Russia

<sup>3</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>4</sup> M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, pos. Moscow., Russia

<sup>5</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

By using acoustic-plasma method were synthesized nanoparticles of various oxides of metals – tungsten, copper, iron, zinc, – and demonstrated that the presence of ultrasonic cavitation in the synthesis of the nanoparticles significantly affects their dimensions and physical characteristics. The sizes of nanoparticles were determined by electron microscopy and laser correlation spectroscopy, the results of which were in good agreement. For example a distinction tungsten oxide nanoparticles photoluminescence spectrum obtained in the absence and in the presence of ultrasonic cavitation. Studies nanoparticles obtained in experiments *in vitro* on various model cell lines did not reveal their cytotoxicity up to the concentration of 0.2 mg/ml and exposure time of 7 days, which indicates good prospects for biomedical applications as a means of diagnosis and magnetic hyperthermia.

Key words: nanoparticles, metal oxides, plasma, ultrasound, cavitation, cytotoxicity

E-mail: [ivavi@yandex.ru](mailto:ivavi@yandex.ru)