

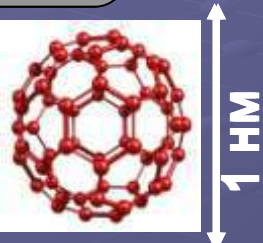
Детекция абиогенных наночастиц

Обзор основных методов

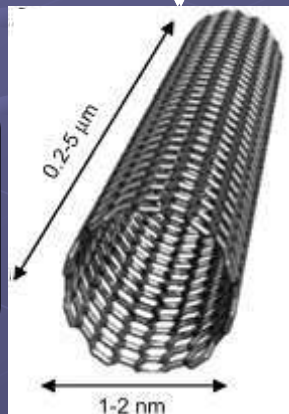
ВИДЫ наноматериалов

на основании форм-фактора

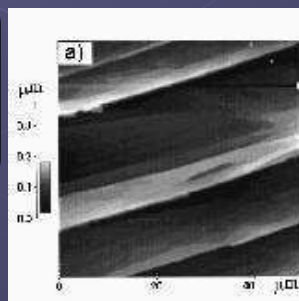
наночастицы



нанотрубки,
нановолокна



нанопленки,
нанопокрyтия



на основании
химического состава

металлические
*Au, Ag, Pt, Pd,
Ru, Ni, Cu*

оксиды металлов и
неметаллов
*SiO₂, Al₂O₃, TiO₂, SnO₂,
ZnO, MoO₃, V₂O₅, PbO,
Fe₂O₃, NiO*

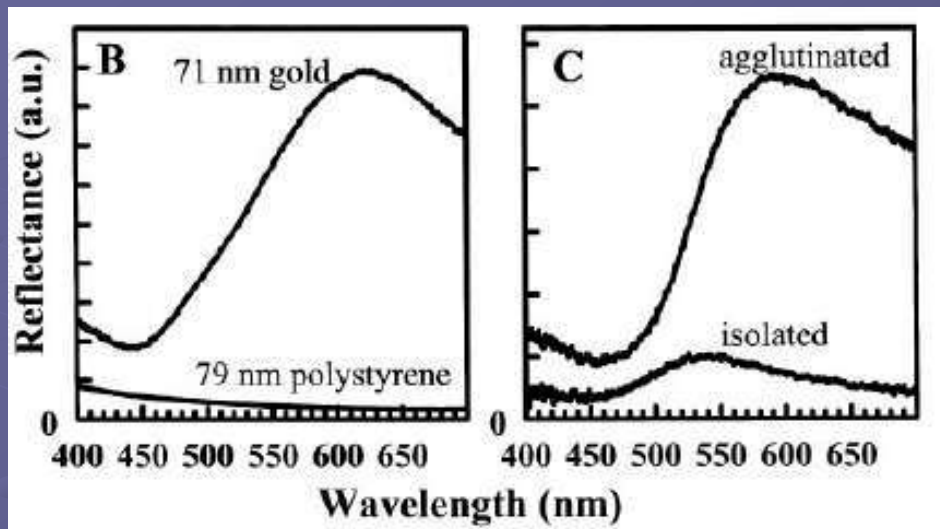
полупроводниковые
*CdS, CdSe, PbS,
PbTe, GaN, GaAs,
InN*

углеродные
C₆₀, C₇₀
нанотрубки

органические
полимеры
дендримеры

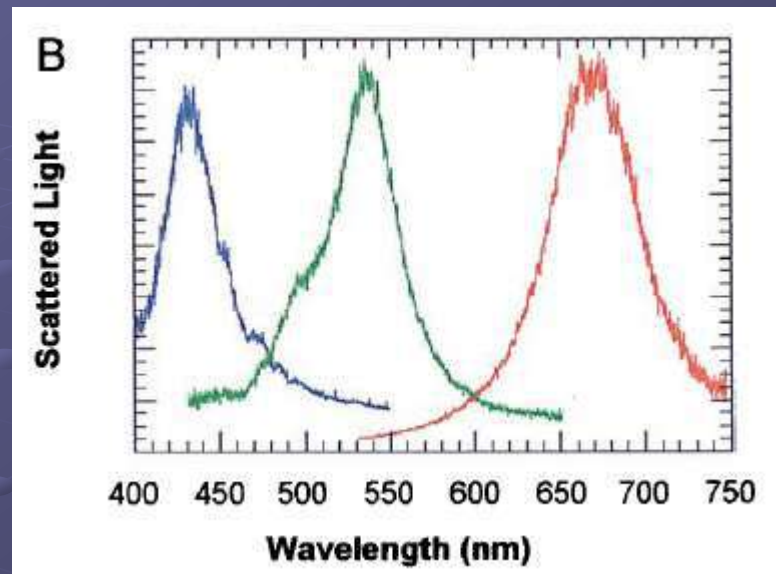
наноглины
*{[Si_nAl_m]Mg_jO₁₀(OH)₂
x Na_k K_k или Ca_k}*

Наночастицы серебра и золота характеризуются наличием плазмонно-резонансного поглощения света



В: Профили упругого рассеяния света наночастицами золота и полистирольными наночастицами

С : Возрастание интенсивности упругого рассеяния света при слипании 12 нм наночастиц золота



Профили упругого рассеяния света наночастицами золота различного размера

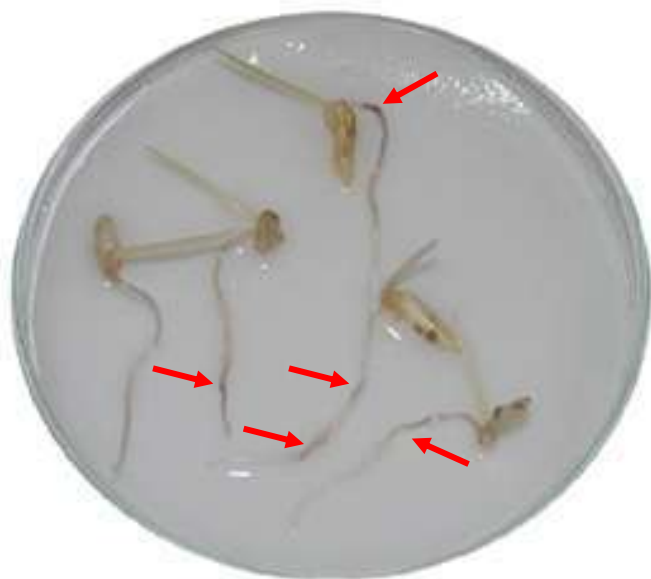
Schultz et al. PNAS 2000

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ - ПРОРОСТКИ ЗЛАКОВ.

24 часа инкубации
с коллоидным золотом 6.9 нм

24 часа инкубации
с коллоидным золотом 12 нм

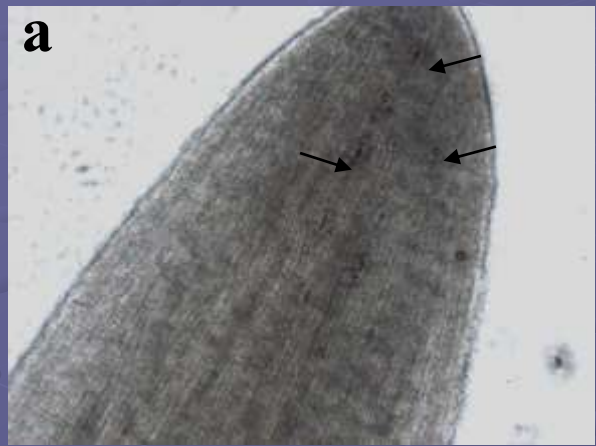
Красные стрелки указывают на окрашенные зоны корня и coleoptily проростков риса *Oryza sativa* L.



Тотальные препараты проростков риса после инкубации с коллоидным золотом 12 нм.

Зоны хроматического окрашивания в разных зонах

колеоптиль



проростка

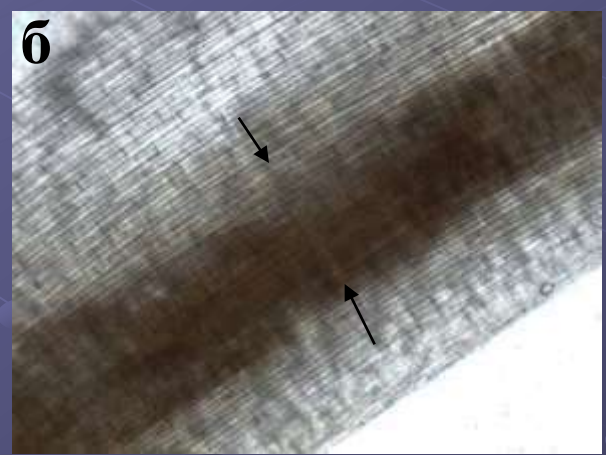
**зона перехода
корня в стебель**



основной корень



**проводящий пучок
колеоптиля**

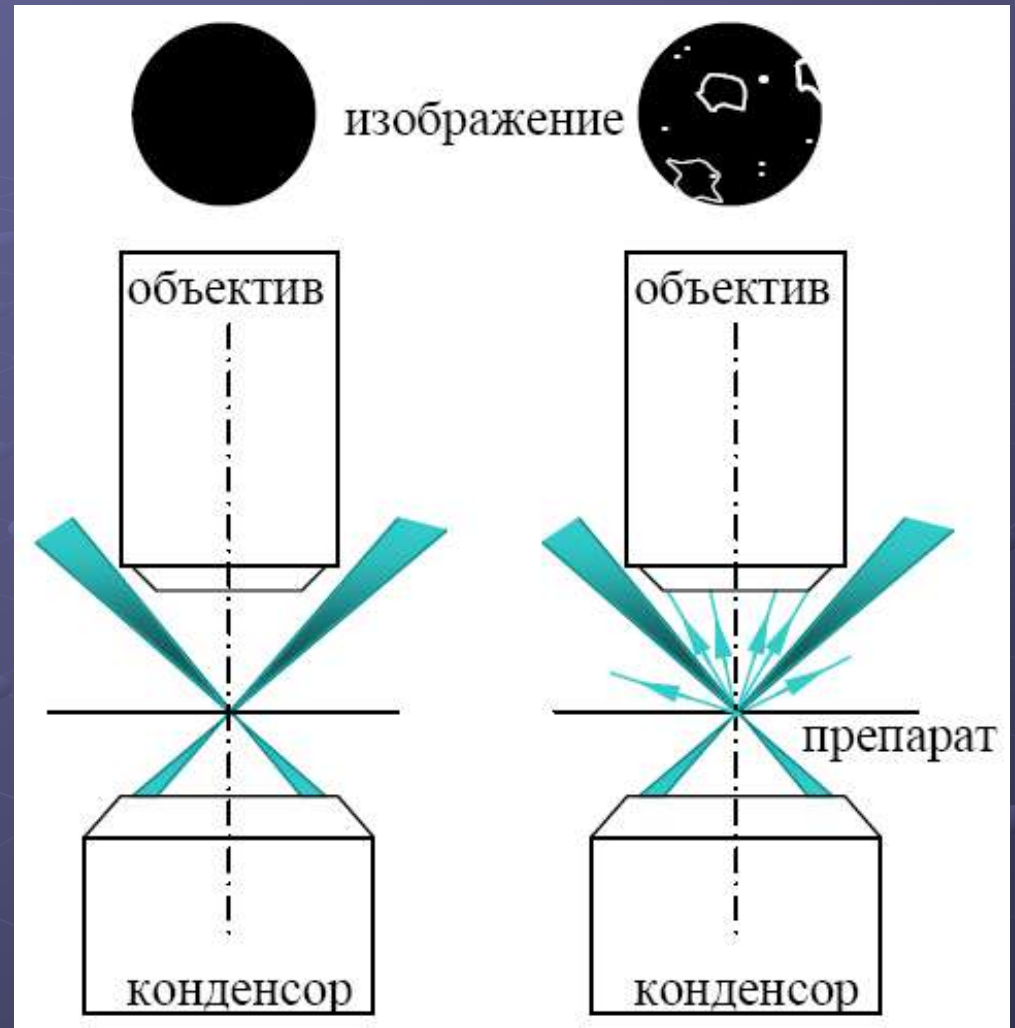
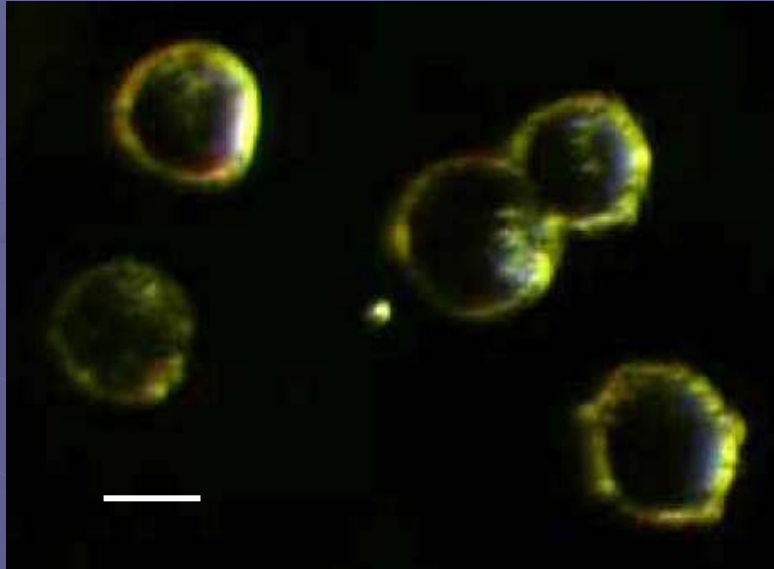


боковой корень



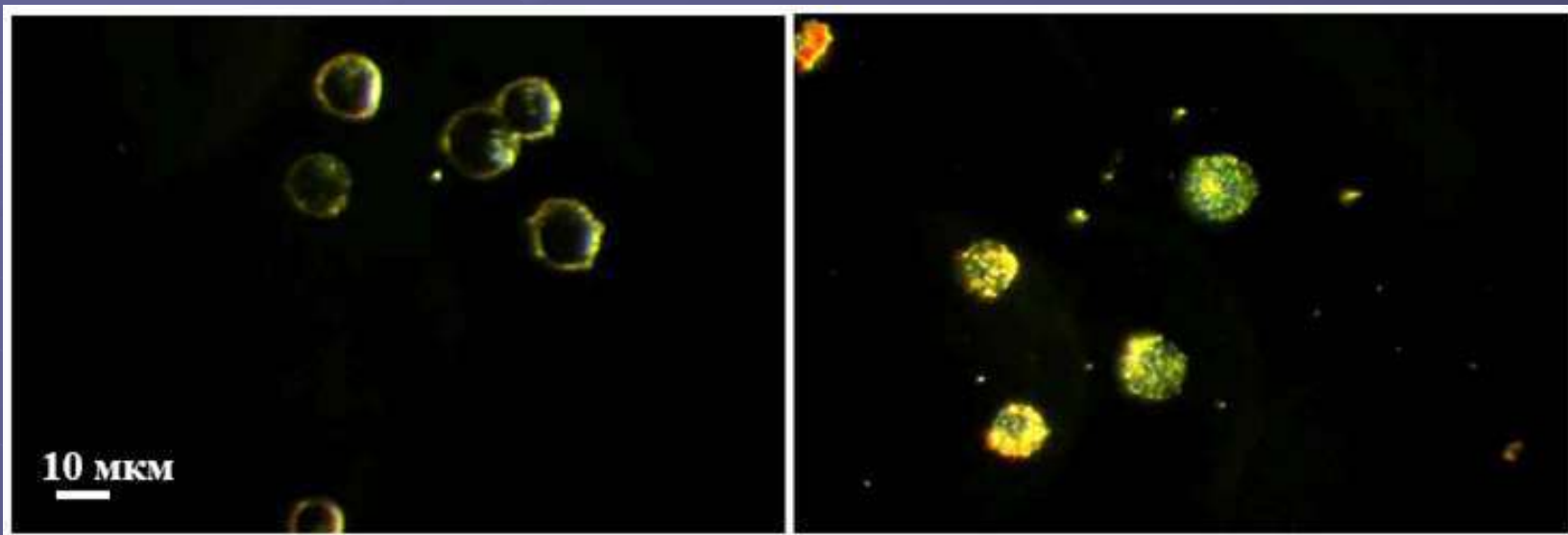
Стрелки указывают на аккумуляцию частиц в:
а – устьицах
б – пучке
в – обкладочных клетках сосуда листа

Метод тёмного поля в проходящем свете



в отсутствии препарата
свет не попадает в
объектив

свет дифрагирует на
неоднородностях
препарата и
попадает в объектив



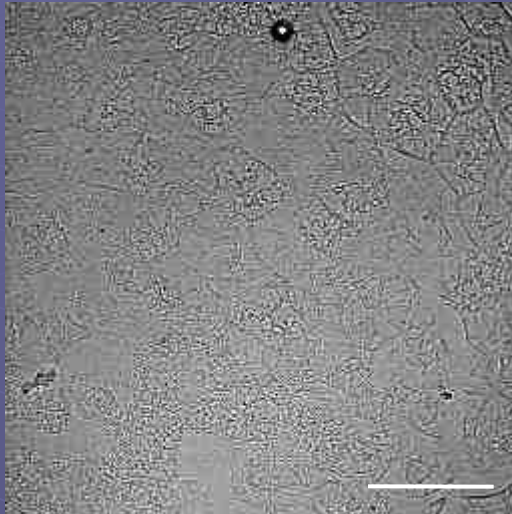
без наночастиц

после введения
наночастиц серебра
(10-50 нм)

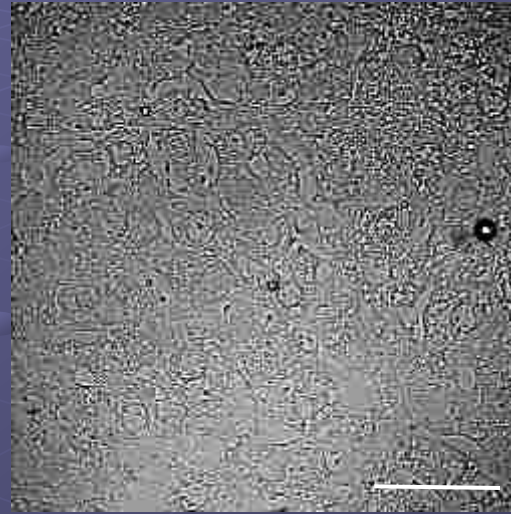
Изображения эритролейкозных клеток K562, полученные с помощью оптической микроскопии темного поля

Конфокальная микроскопия рассеяния света срезы печени мыши

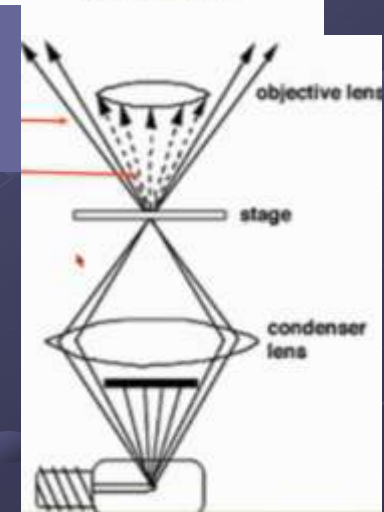
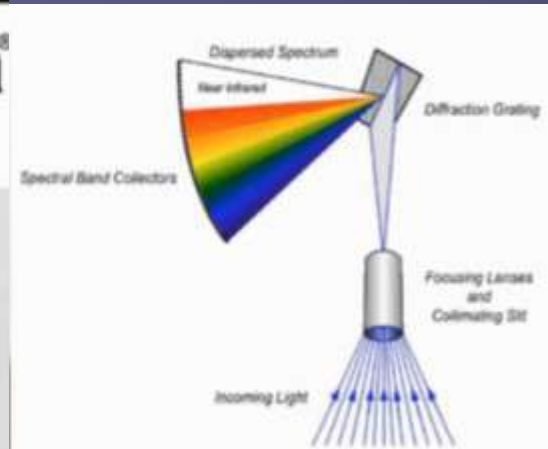
Контроль



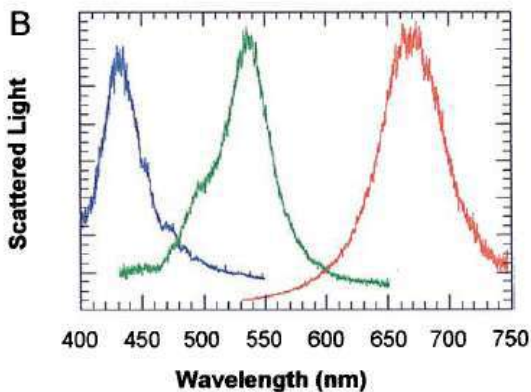
после введения
35-нм наночастиц золота



Dark-field hyperspectral imaging analysis

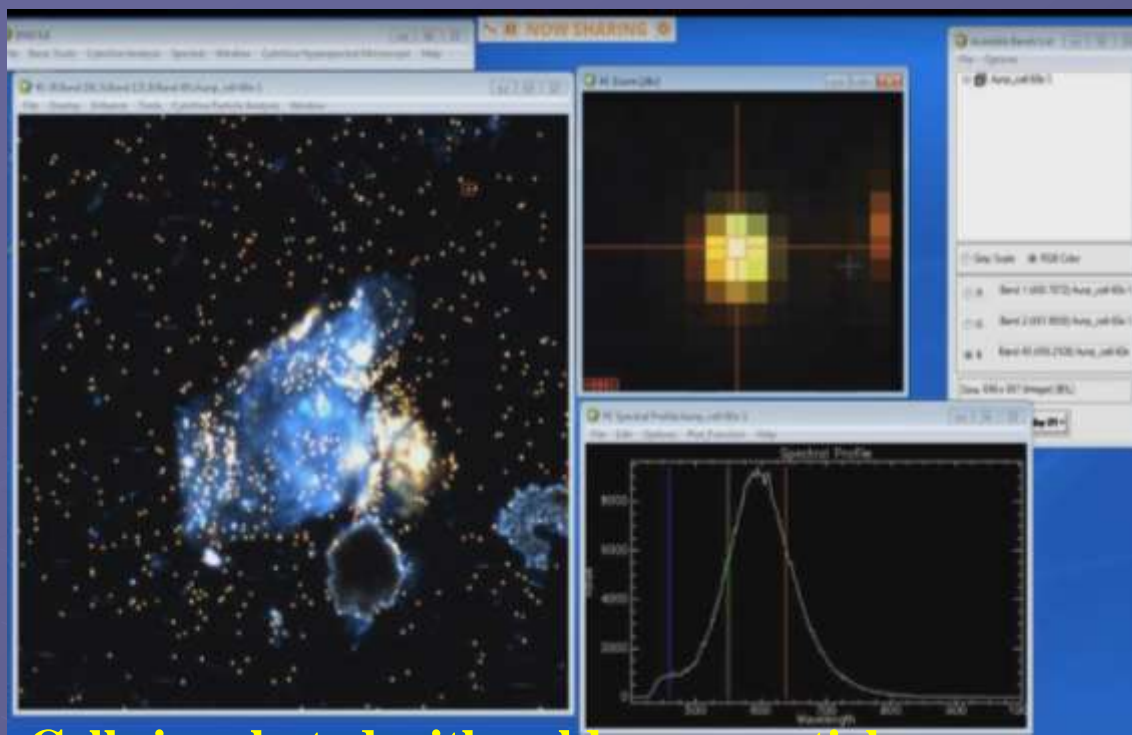


<http://cytoviva.com/>

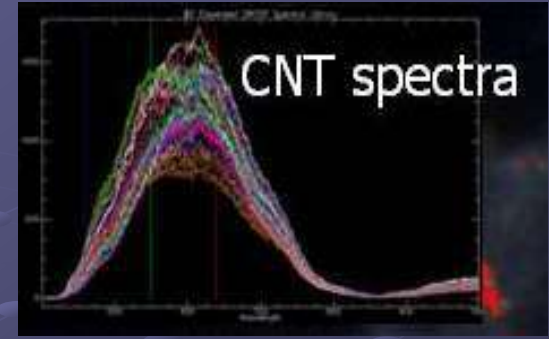


Профили упругого рассеяния света наночастицами золота различного размера

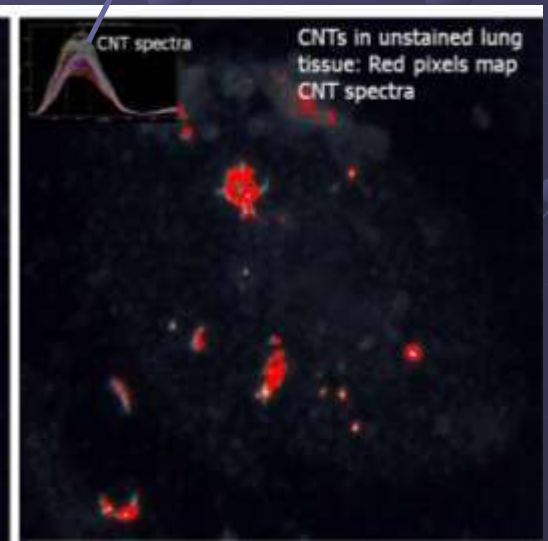
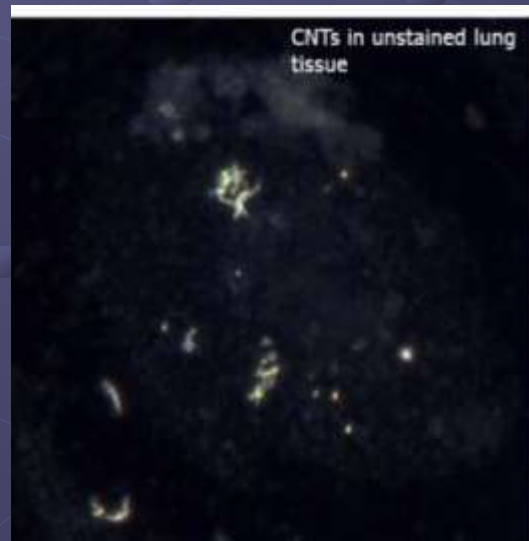
Schultz et al. PNAS 2000

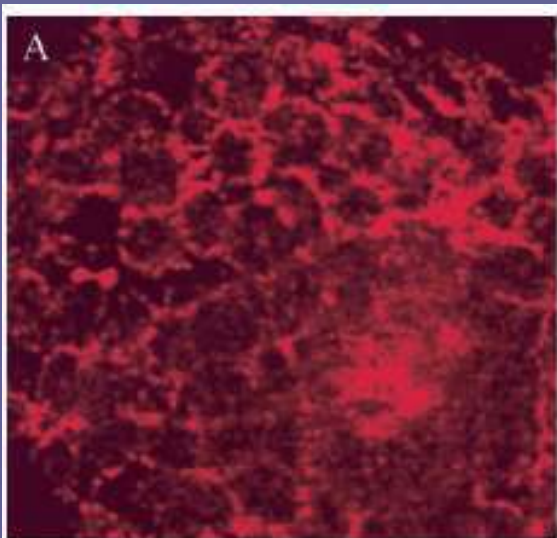


Cells incubated with gold nanoparticles



carbon nanotubes in unstained lung tissues

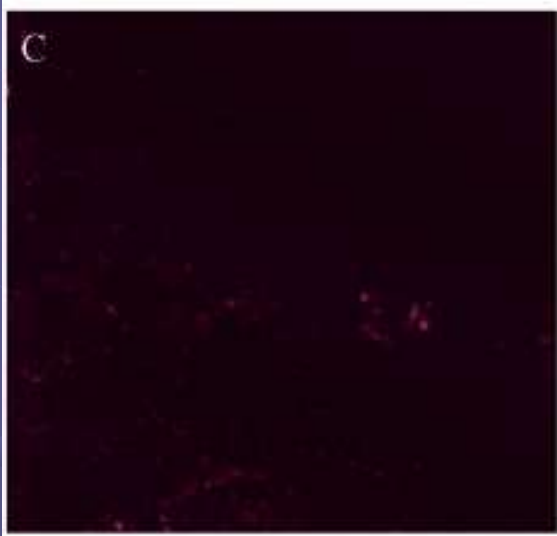




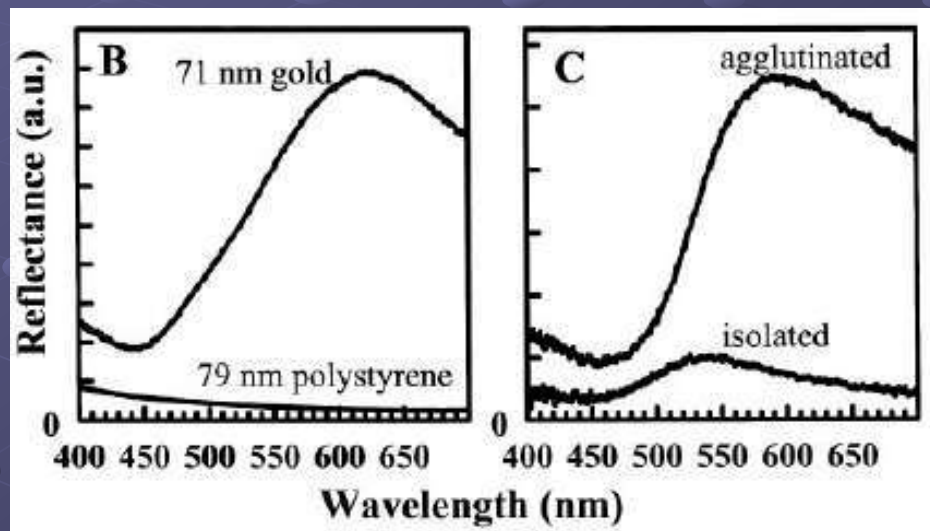
Антитела на EGFR конъюгировали с наночастицами золота (12 нм).

Антителами «окрашивали» предраковые и нормальные биопробы тканей шейки матки

Методом конфокальной микроскопии светорассеяния регистрировали распределение наночастиц золота.



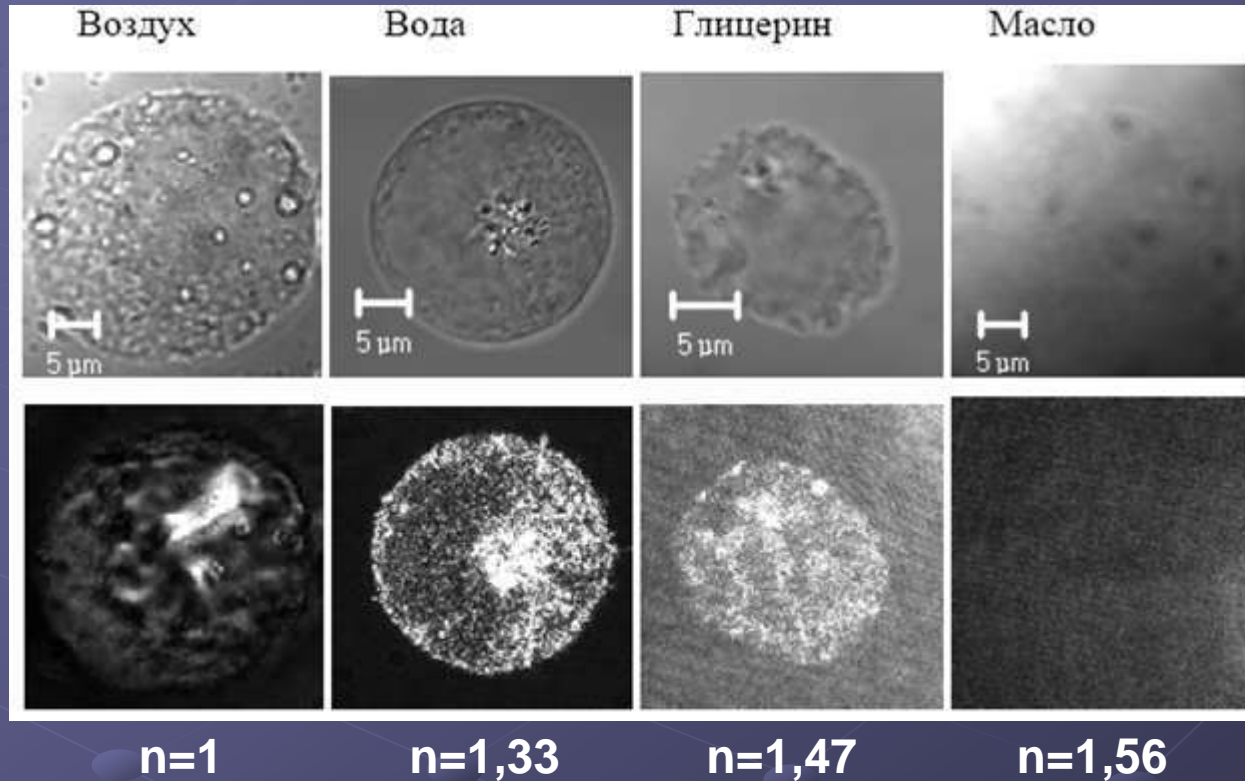
Sokolov et al. Cancer Res. 2003



В: Профили упругого рассеяния света наночастицами золота и полистирольными наночастицами

С : Возрастание интенсивности упругого рассеяния света при слипании 12 нм наночастиц золота

Пробоподготовка, уменьшающая собственное светорассеяние клеток: фиксация, высушивание на стекле, аккуратная промывка для удаления кристаллов соли и выравнивание показателя преломления

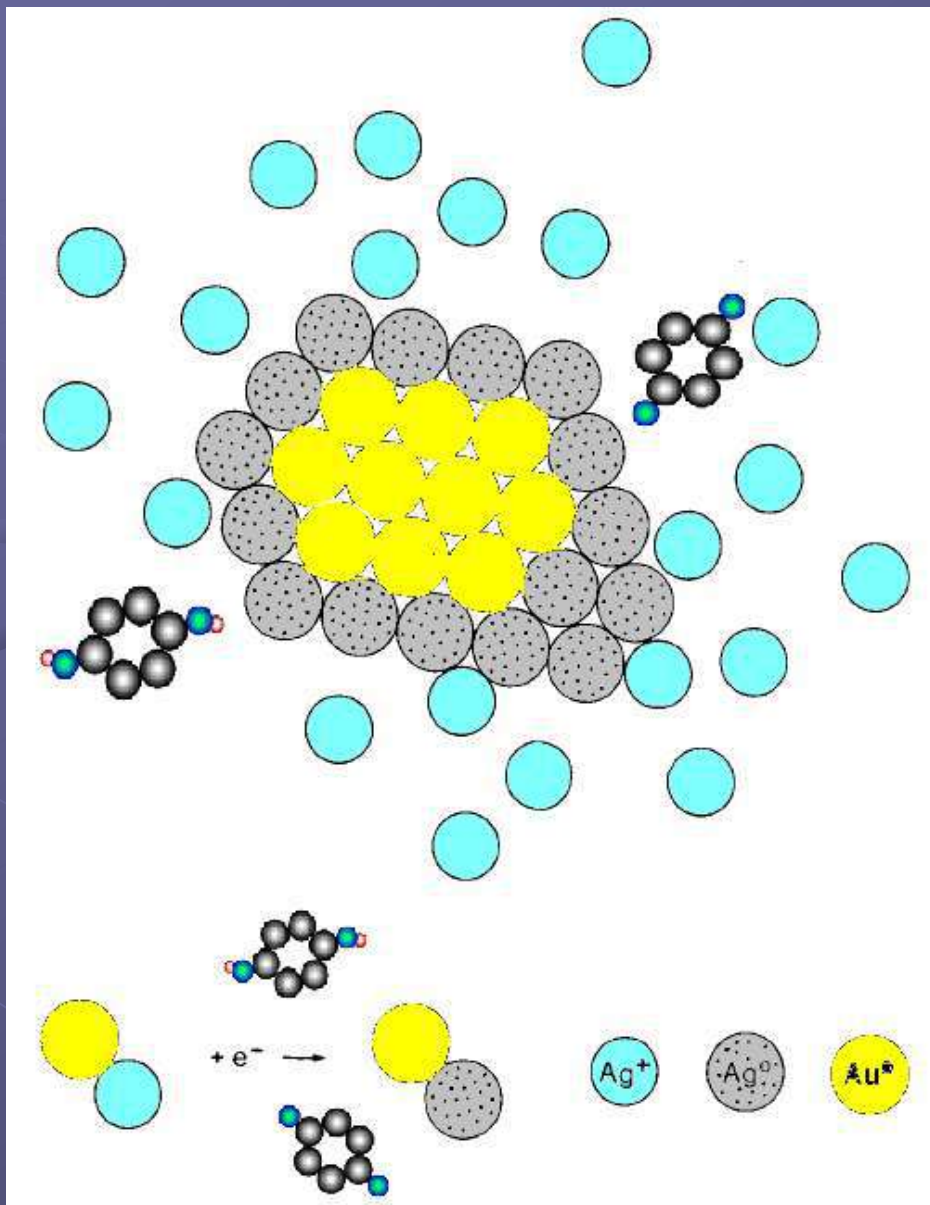


Фиксаторы

Рекомендуются - параформальдегид, метанол.

Не рекомендуются - формалин, глутаровый альдегид

Автометаллография



- благородные металлы (Ag, Au)
- тяжелые металлы (Cu, Zn, Fe, Cd)
- оксиды тяжелых металлов (ZnO, CuO, Fe₂O₃, CdO)

Аутометаллография наночастиц благородных металлов (серебро, золото, платина) в срезах тканей

Приготовление срезов для аутометаллографирования:

Предпочтительно – криостатные срезы 10-30 мкм

Возможно – парафиновые срезы 10-30 мкм

Процедура аутометаллографирования

Готовится «проявитель»

раствор А - 60 мл 33% раствора гуммиарабика и 10 мл цитратного буфера (0,25 мг/мл лимонной кислоты, 0,24 мг/мл цитрата натрия);

раствор Б - раствор гидрохинона 60 мг/мл;

раствор В - лактата серебра 8 мг/мл

$A : B : B = 7 : 1,5 : 1,5$

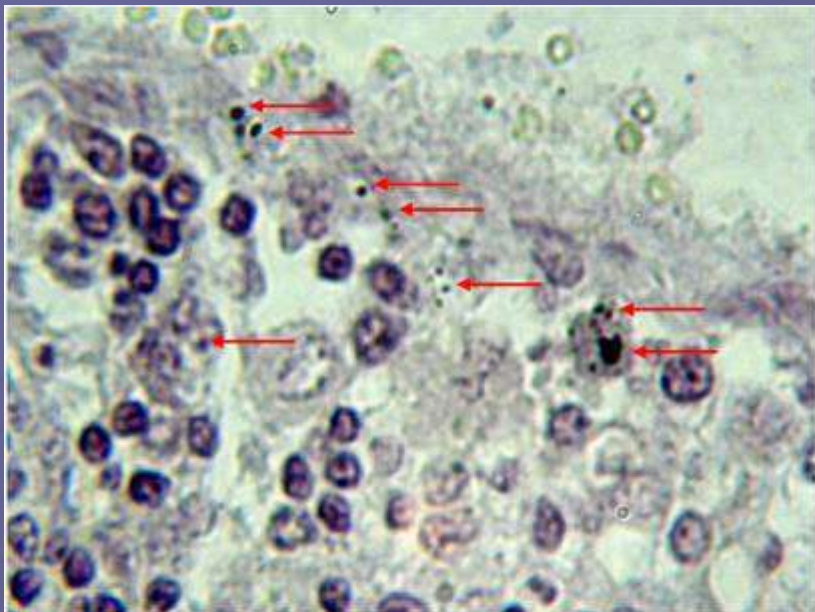
Срез инкубируется в «проявителе» в полной темноте (1 ч, 26 °С)

Промывка среза водой

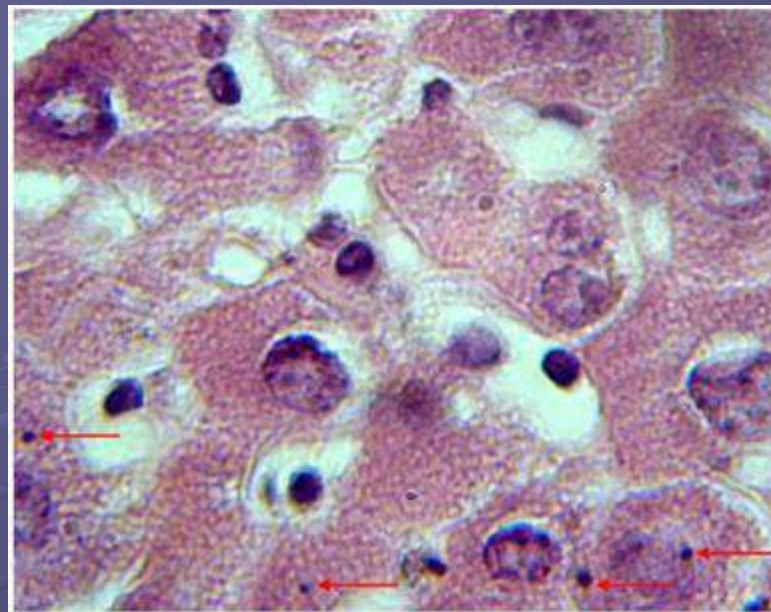
«Фиксация» в 5% тиосульфате натрия 10 мин

Промывка проточной водой 20 минут.

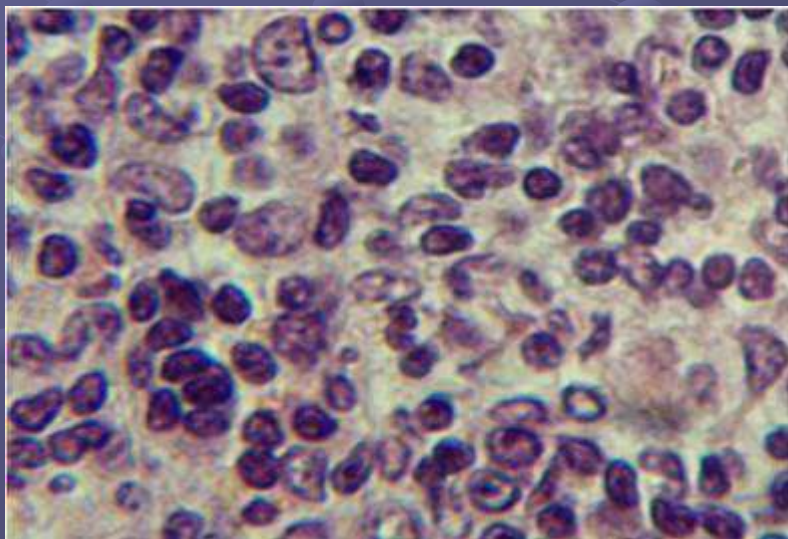
Гистохимическое окрашивание гематоксилином и эозином



наночастицы серебра (11 нм) в срезе лимфатического узла мышцы после аутометаллографирования и гистохимического окрашивания

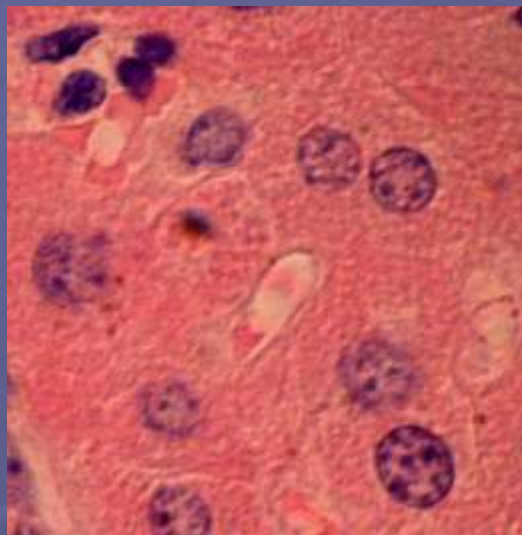


наночастицы золота (35 нм) в срезе печени мышцы после аутометаллографирования и гистохимического окрашивания

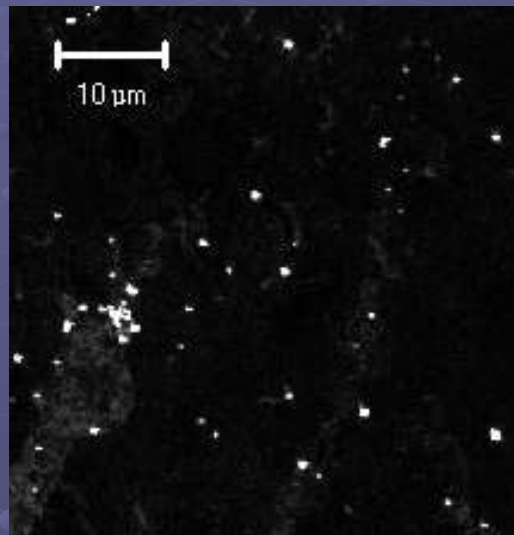


контрольный срез лимфатического узла после аутометаллографирования и гистохимического окрашивания

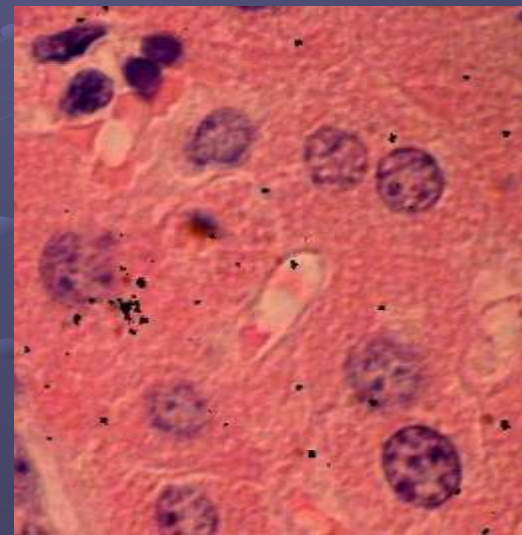
Комбинирование методов проходящего белого света и
ЛСКМ в режиме регистрации светорассеяния от
наночастиц серебра.



Светлое поле



ЛСКМ в режиме рассеяния



Наложение

Срезы после процедуры автометаллографии и окрашивания
гематоксилин-эозином

Аутометаллография наночастиц металлов, таких как цинк, медь, свинец, и их оксидов металлов в срезах тканей

Предварительно требуется сульфидирование или селенидирование поверхности наночастиц

Сульфидирование поверхности наночастиц

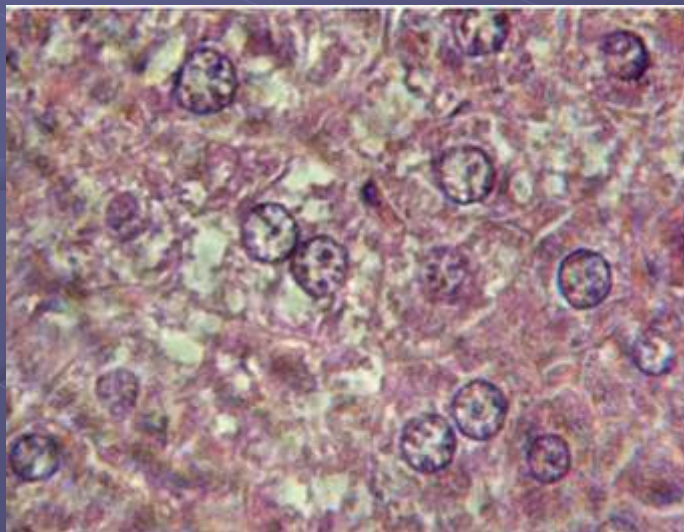
Срезы инкубируют (3 дня, 4 °С) с сульфидирующим раствором (0,1 М буферный раствор Зоренсена рН 7,4, 0,1 % сульфида натрия, 3 % глутарового альдегида).

Отмывка фосфатным солевым буфером

Аутометаллографирование серебром

Гистохимическое окрашивание

Срезы тканей мышей после инъекции наночастиц оксида цинка (50 нм), сульфидирования, аутометаллографирования и гистохимического окрашивания

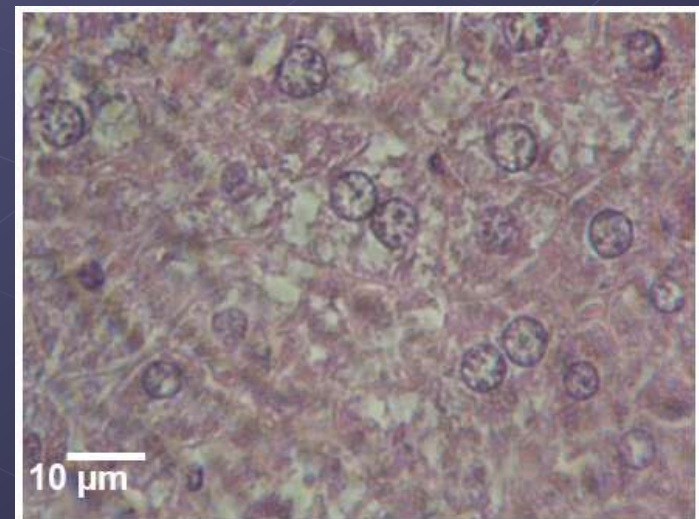
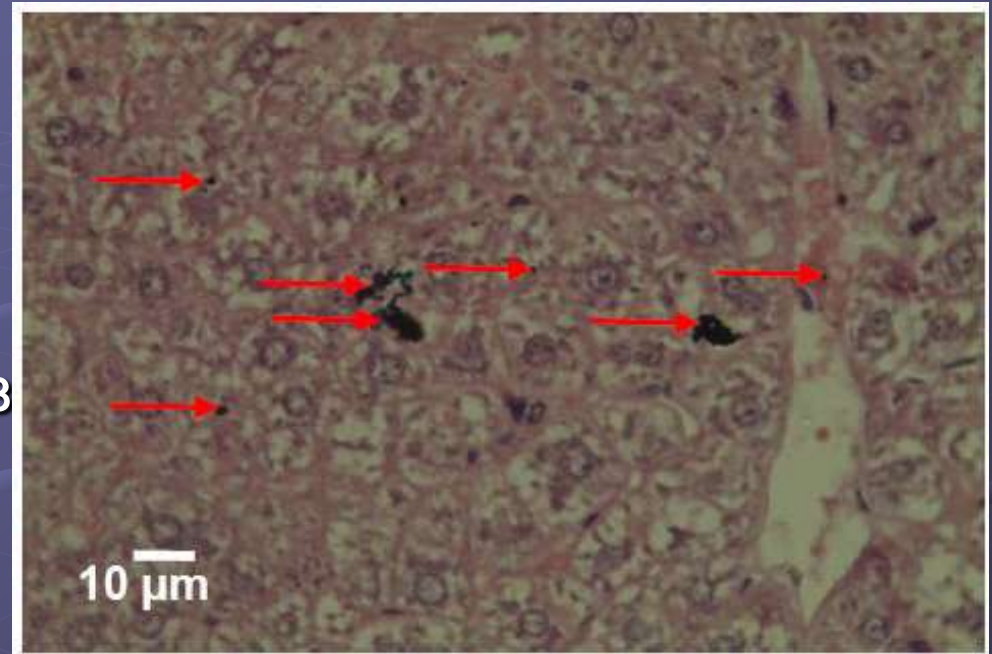


Контрольный срез печени без инъекции наночастиц после сульфидирования, аутометаллографирования и гистохимического окрашивания

Источники артефактов, возникающих при автометаллографической детекции наночастиц

пробоподготовка

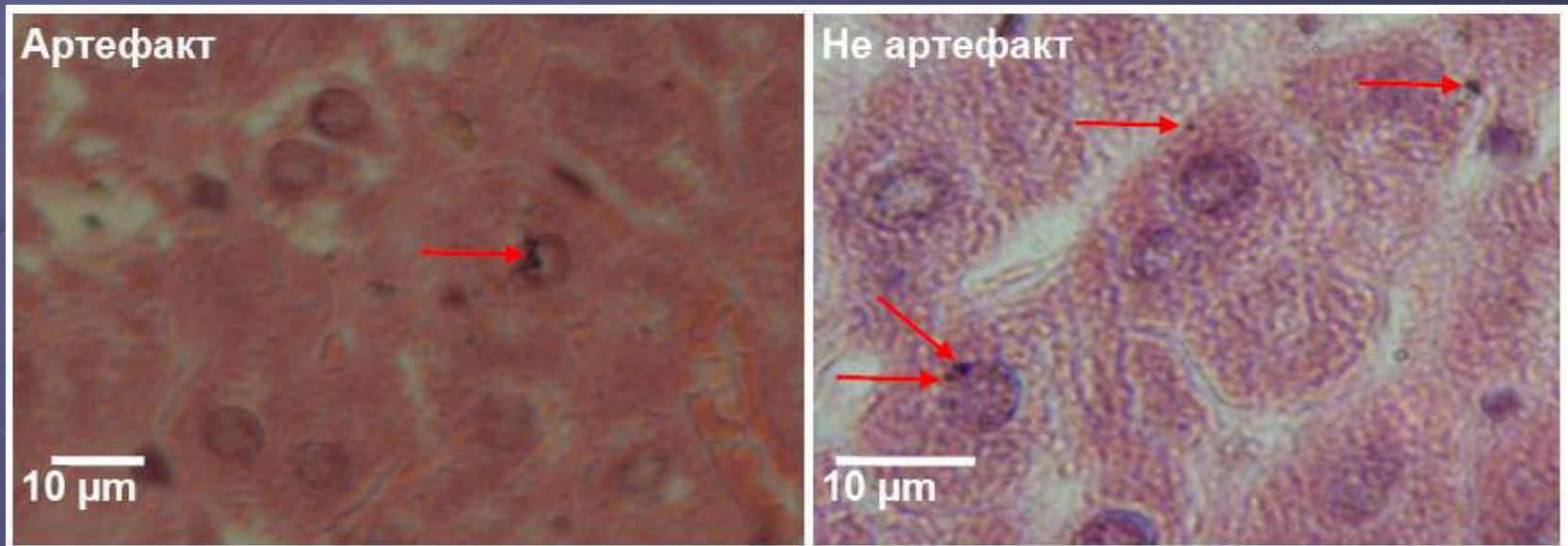
- неспецифическое осаждение серебра из раствора
- увеличение времени экспозиции;
- воздействие света на раствор;
- низкое качество реагентов



Источники артефактов, возникающих при автометаллографической детекции наночастиц

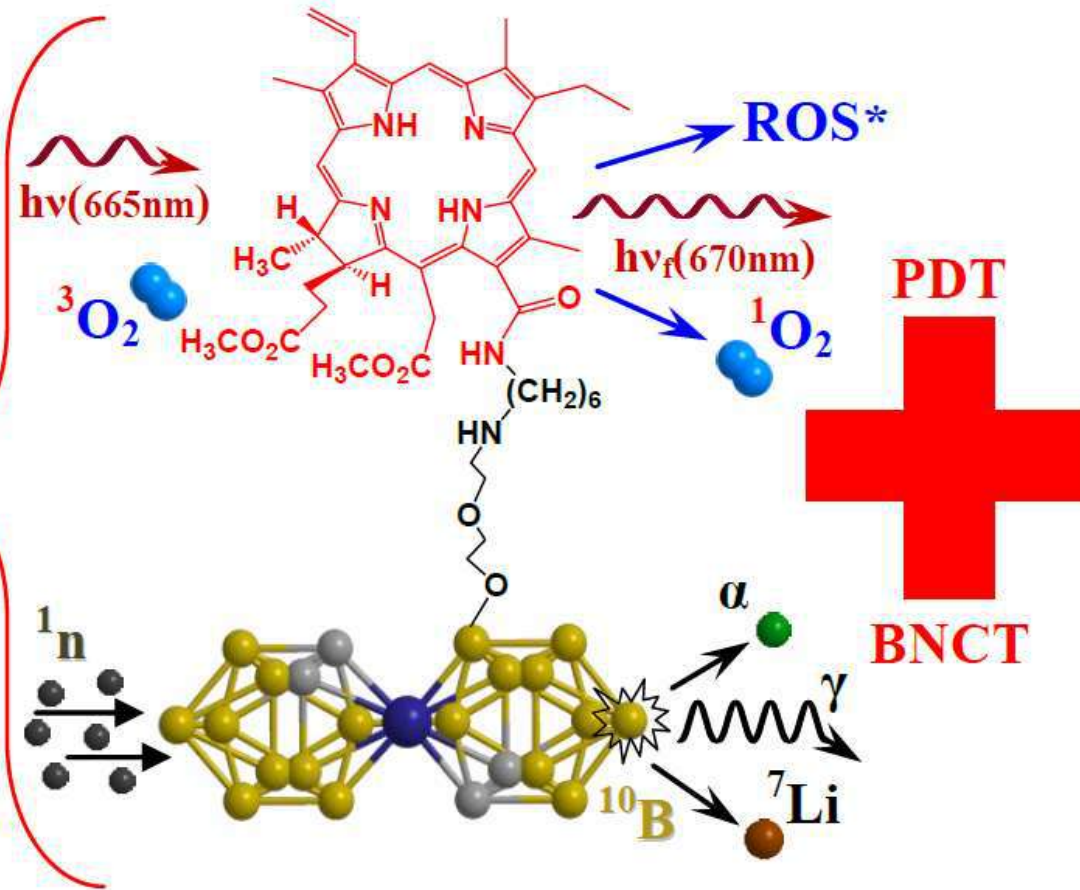
ЭНДОГЕННЫЕ ЧАСТИЦЫ И ИОНЫ

- аргирофильные белки в ядре
- ионы железа в селезенке
- ионы цинка в тканях нервной системы

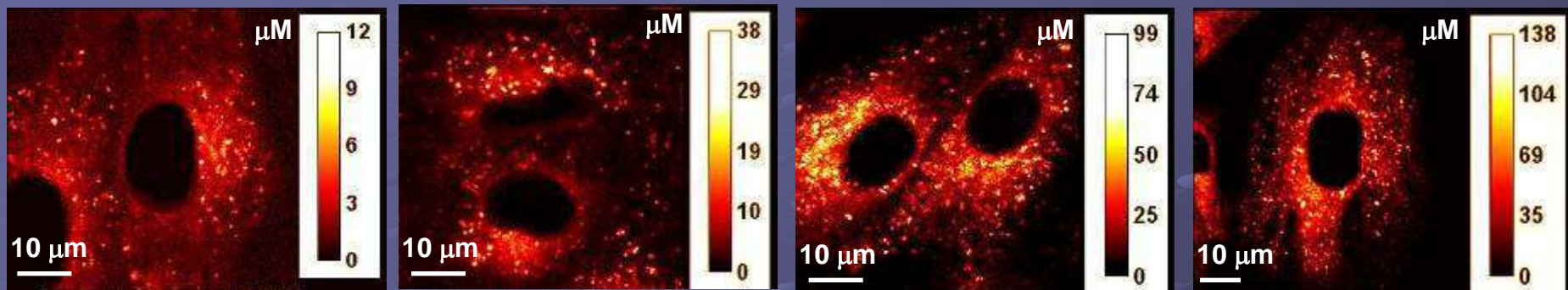


$LD_{50}(h\nu) = 80 \text{ nM}$
 $\Phi(^1O_2) = 0.76$
 $C(^{10}B) > 10^9 \text{ atoms/cell}$

*Reactive oxygen species
 other than 1O_2



Intracellular distribution of the conjugates in A549 human lung adenocarcinoma cells

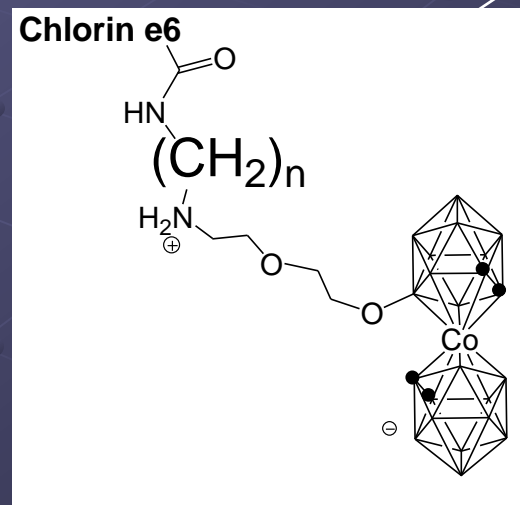
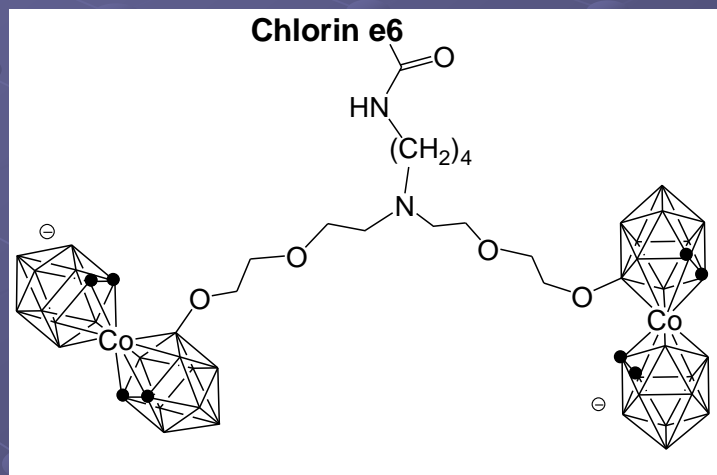


n=4, di

n=2

n=4

n=6



Incubation: 0.5 μM for 2 h

Confocal laser scanning microscopy measurements