

# Детекция абиогенных наночастиц

Обзор основных методов

# ВИДЫ наноматериалов

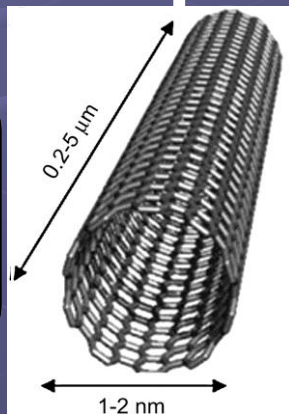
на основании форм-фактора

наночастицы

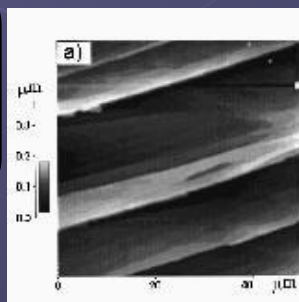


1 nm

нанотрубки,  
нановолокна



нанопленки,  
нанопокрyтия



на основании  
химического состава

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

оксиды металлов и  
неметаллов  
*SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>,  
ZnO, MoO<sub>3</sub>, V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, PbO,  
Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NiO*

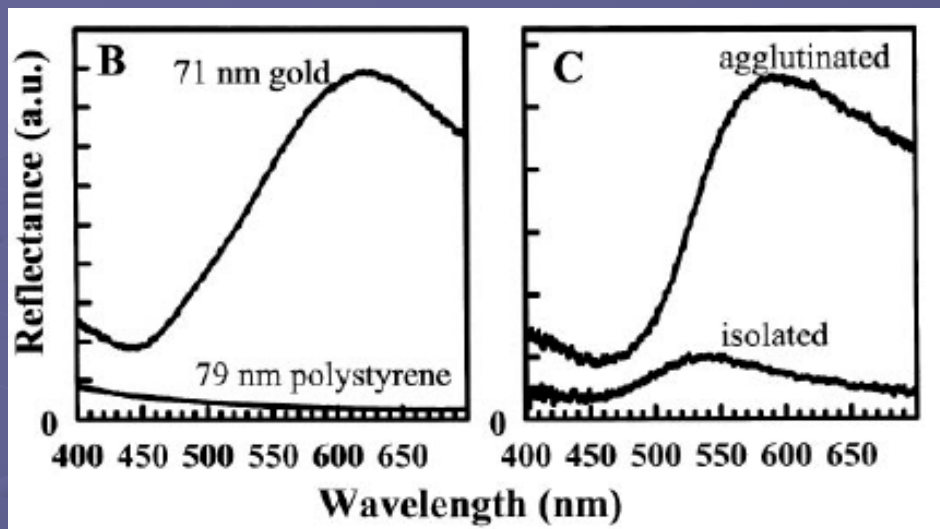
полупроводниковые  
*CdS, CdSe, PbS,  
PbTe, GaN, GaAs,  
InN*

углеродные  
*C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>*  
нанотрубки

органические  
полимеры  
дендримеры

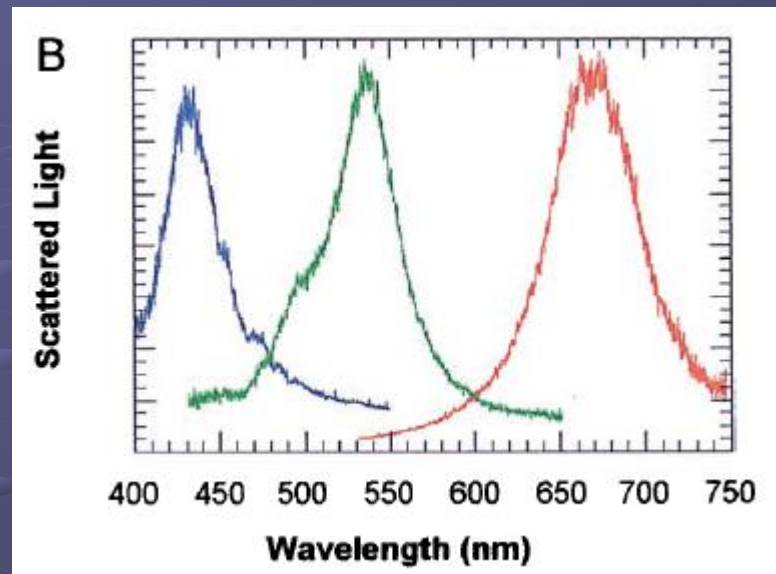
наноглины  
*{[Si<sub>n</sub>Al<sub>m</sub>]Mg<sub>j</sub>O<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>  
x Na<sub>k</sub> K<sub>k</sub> или Ca<sub>l</sub>}*

# 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

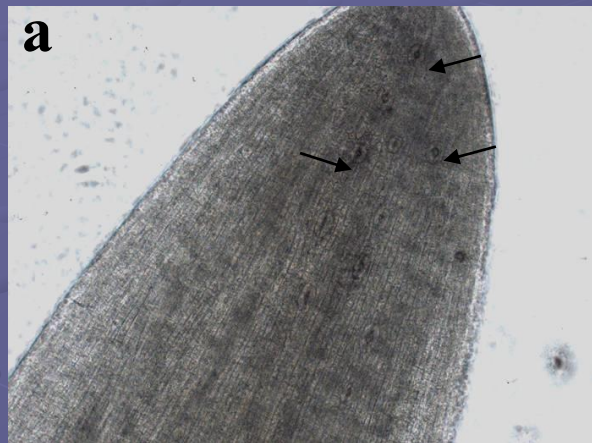
24 часа инкубации  
с коллоидным золотом 12 нм

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

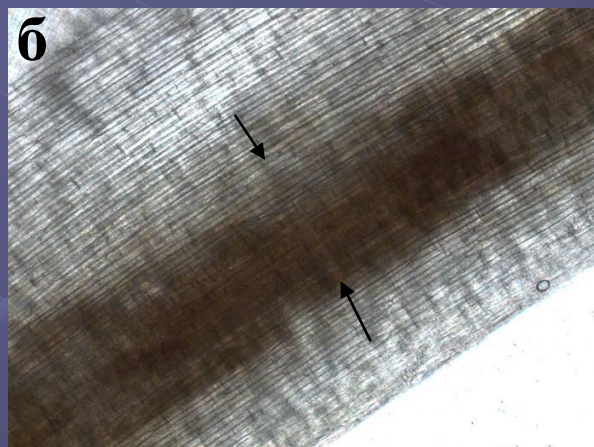


# Тотальные препараты проростков риса после инкубации с коллоидным золотом 12 нм. Зоны хроматического окрашивания в разных зонах

колеоптиль

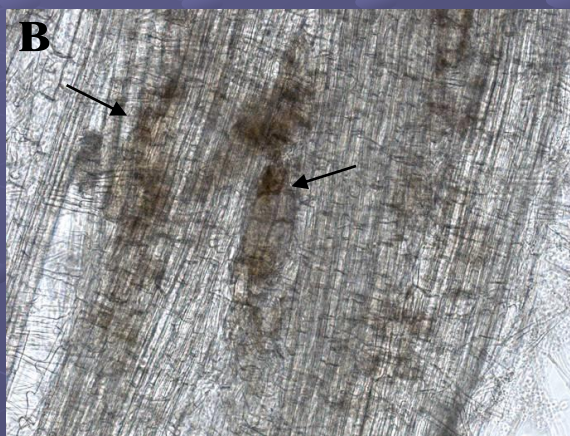


проводящий пучок  
колеоптиля



проростка

зона перехода  
корня в стебель

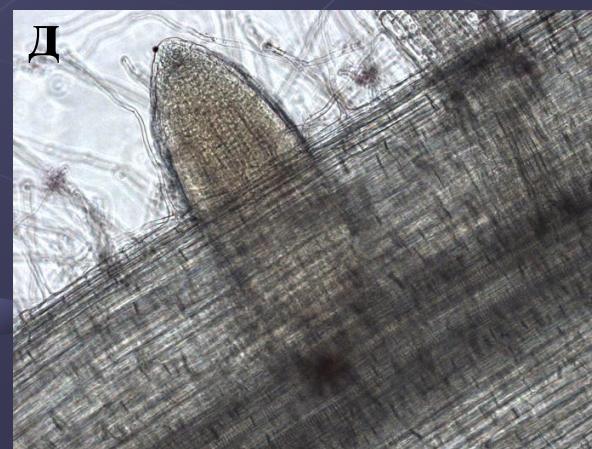


Стрелки указывают на  
аккумуляцию частиц в:  
а – устьицах  
б – пучке  
в – обкладочных клетках  
сосуда листа

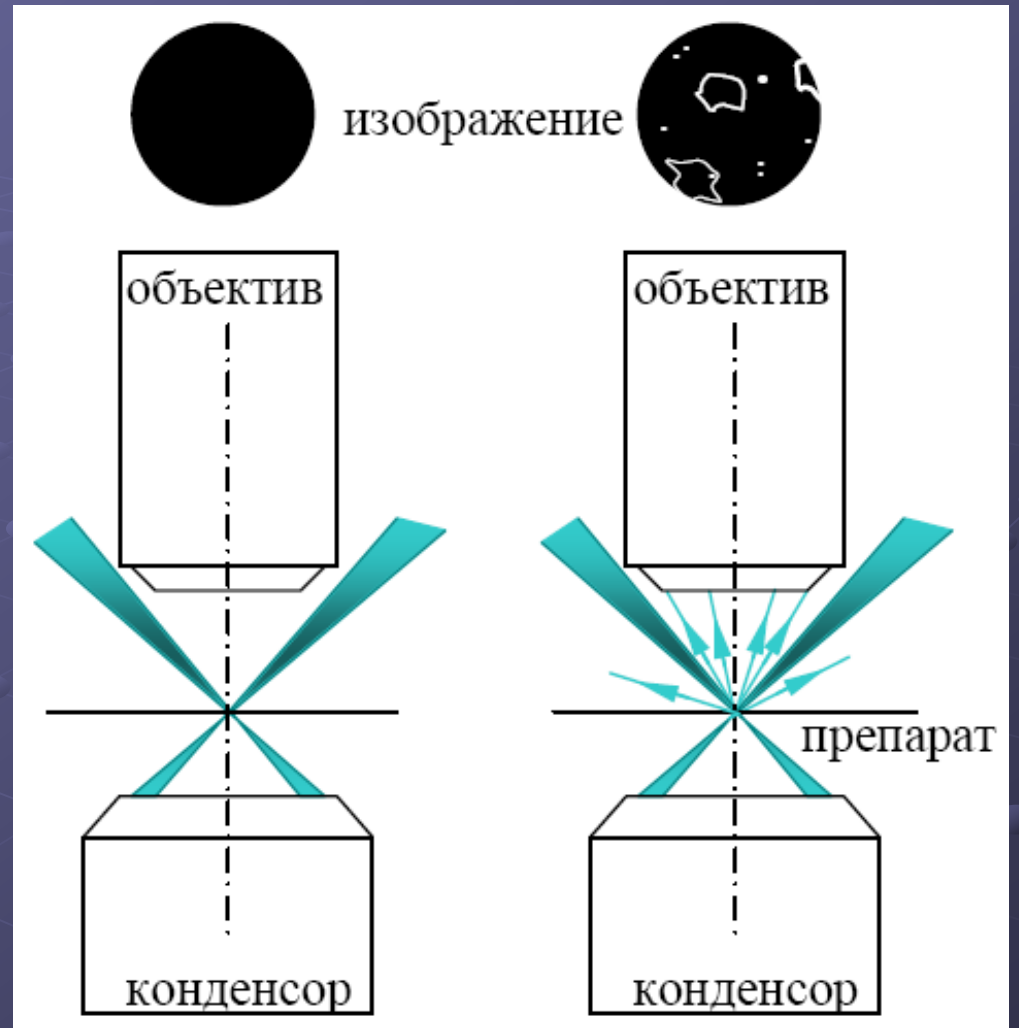
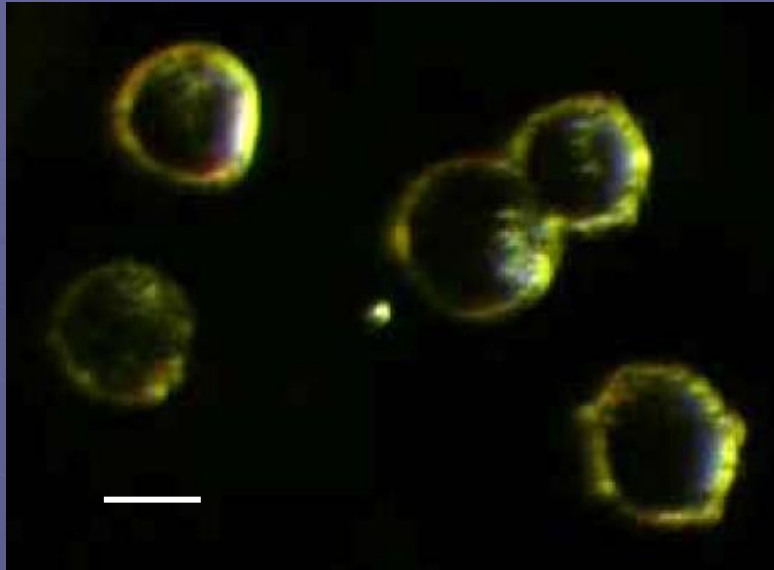
основной корень



боковой корень

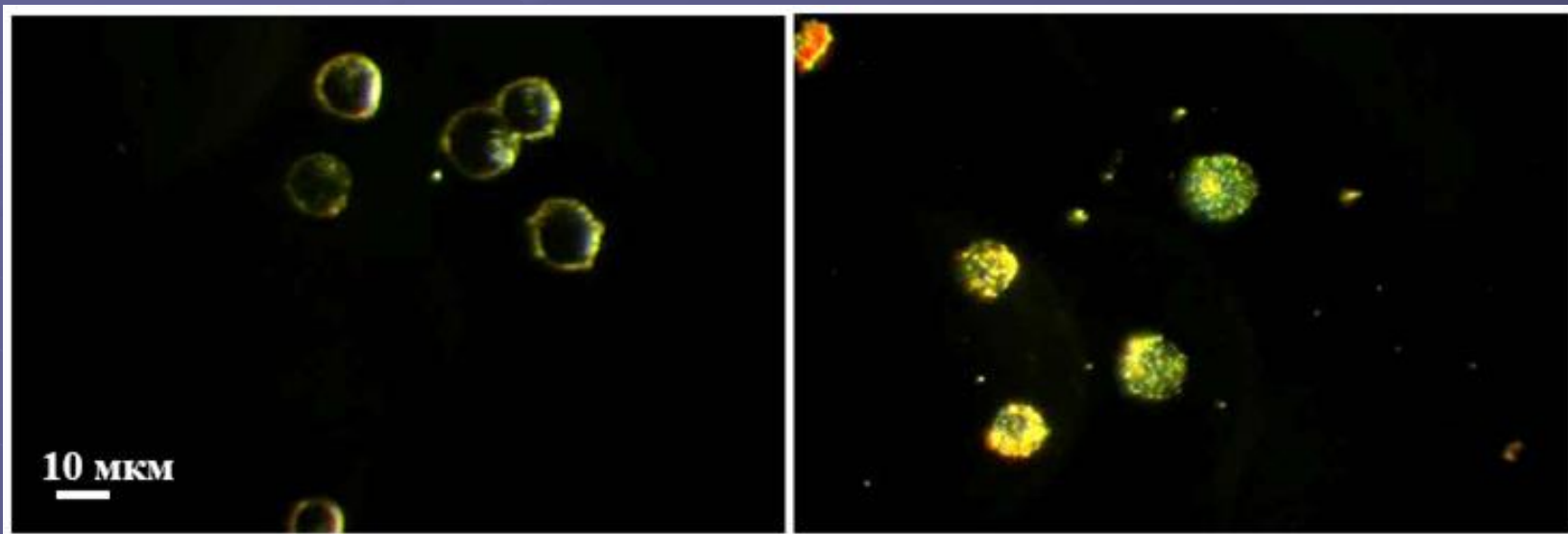


# Метод тёмного поля в проходящем свете



в отсутствии препарата  
свет не попадает в  
объектив

свет дифрагирует на  
неоднородностях  
препарата и  
попадает в объектив



без наночастиц

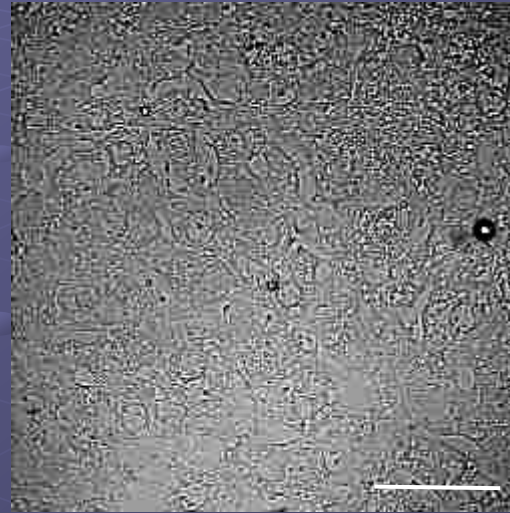
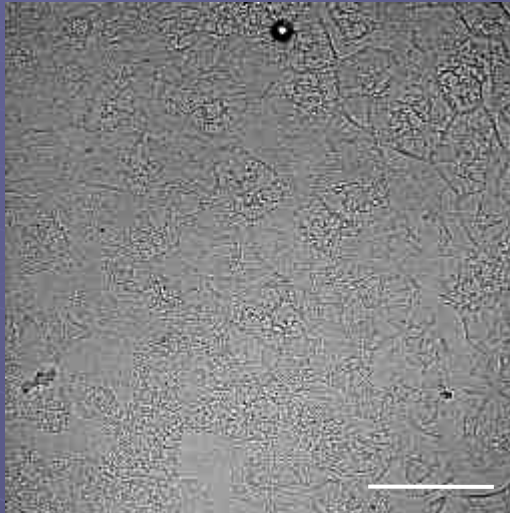
после введения  
наночастиц серебра  
(10-50 нм)

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



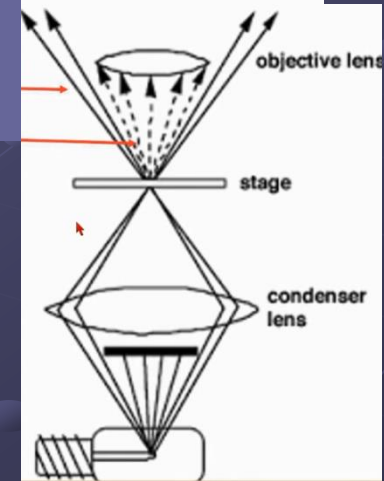
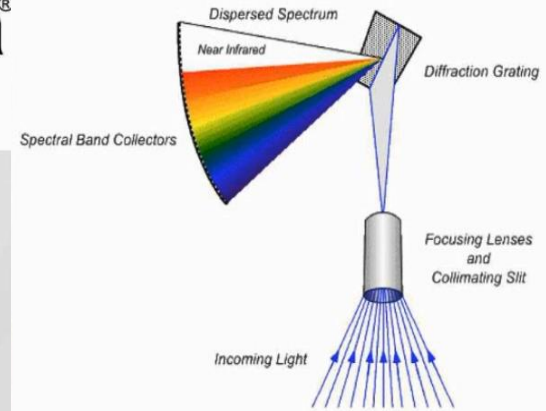
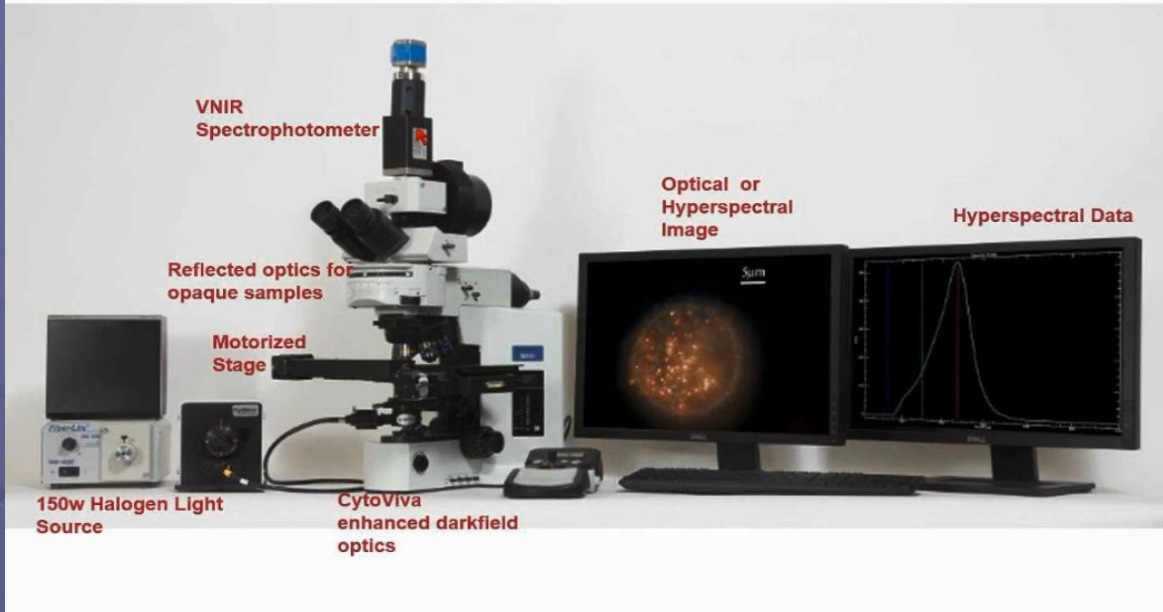


# Dark-field hyperspectral imaging analysis

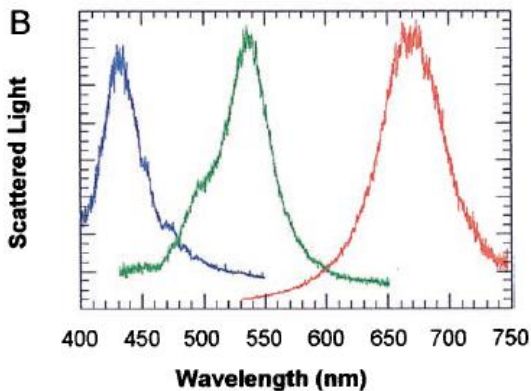
CytoViva System

NOW SHARING

# CytoViva®

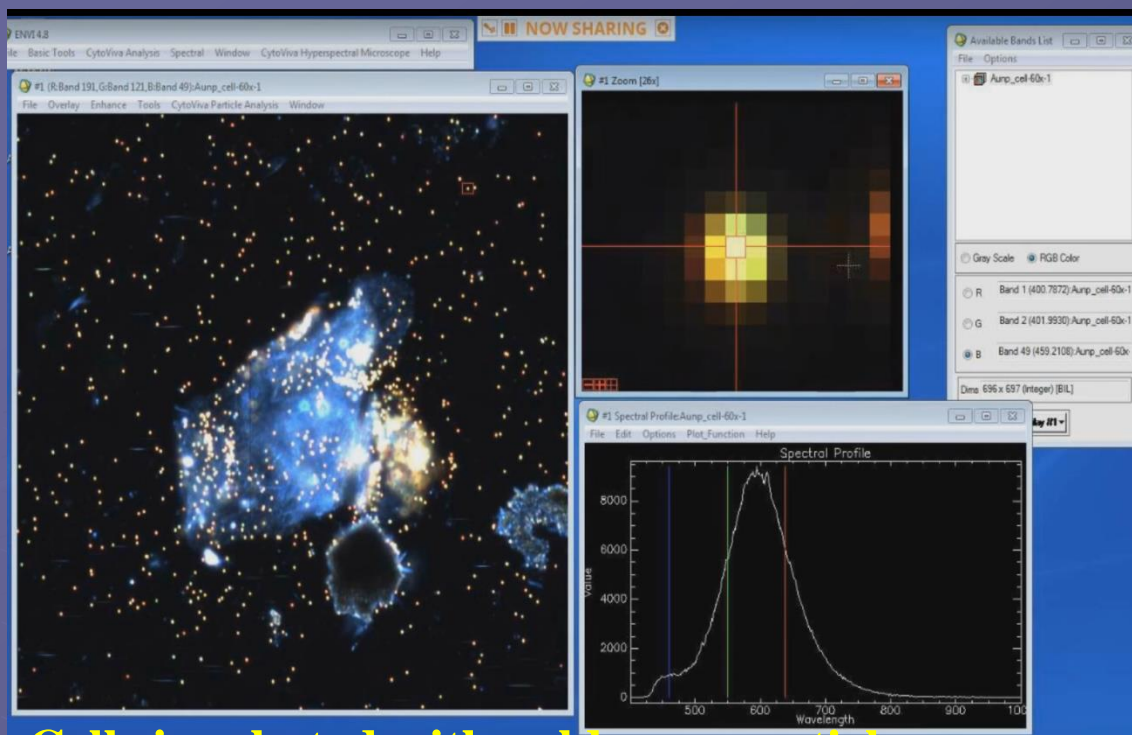


<http://cytoviva.com/>

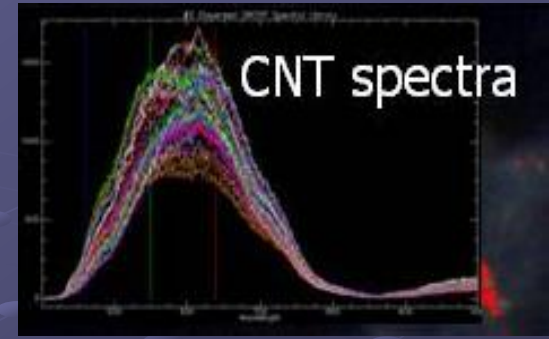


Профили упругого рассеяния света наночастицами золота различного размера

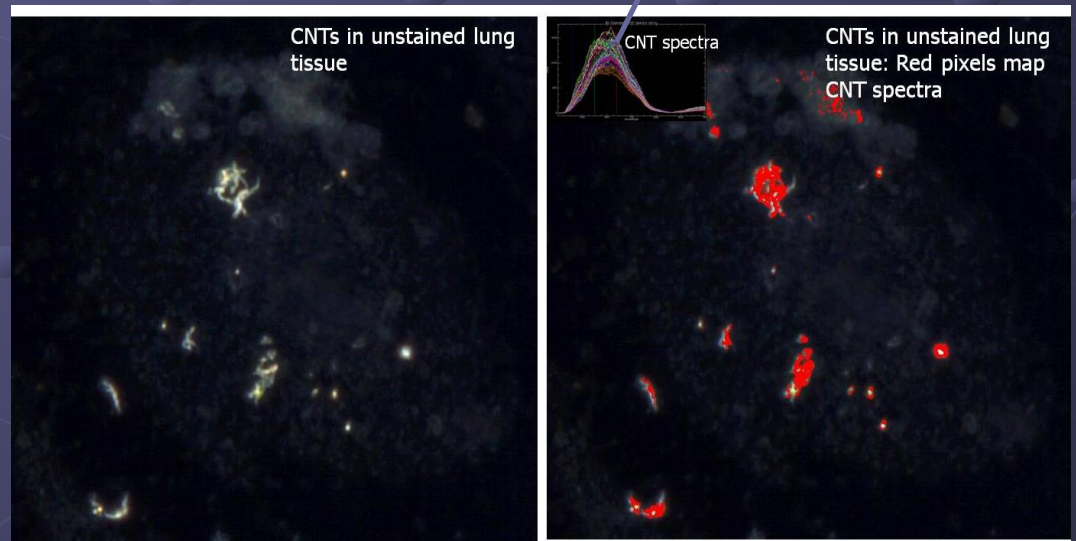
Schultz et al. PNAS 2000

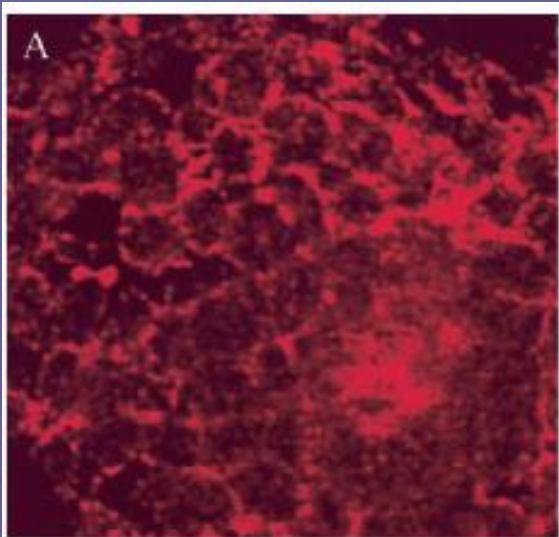


**Cells incubated with gold nanoparticles**



**carbon nanotubes in unstained lung tissues**

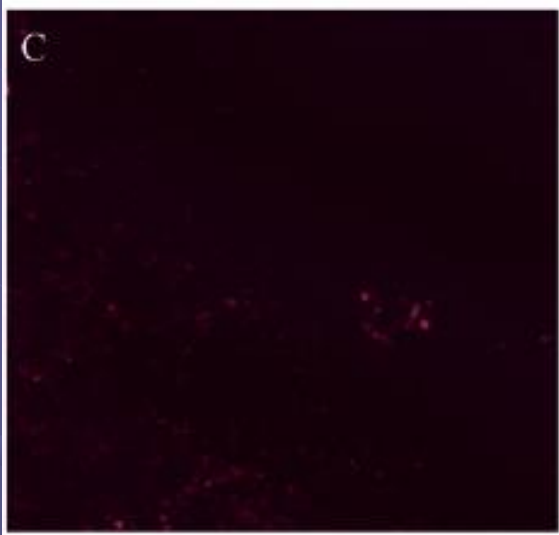




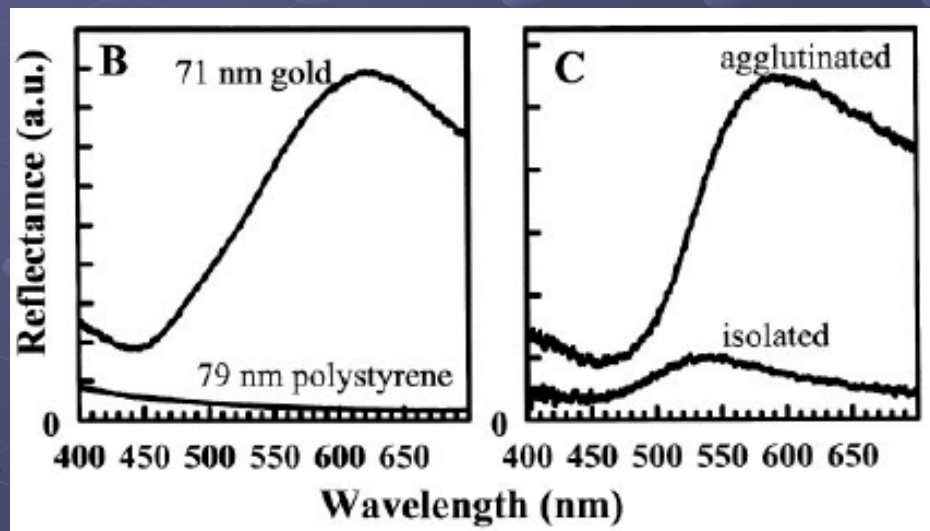
Антитела на EGFR конъюгировали с наночастицами золота (12 нм).

Антителами «окрашивали» предраковые и нормальные биопробы тканей шейки матки

Методом конфокальной микроскопии светорассеяния регистрировали распределение наночастиц золота.



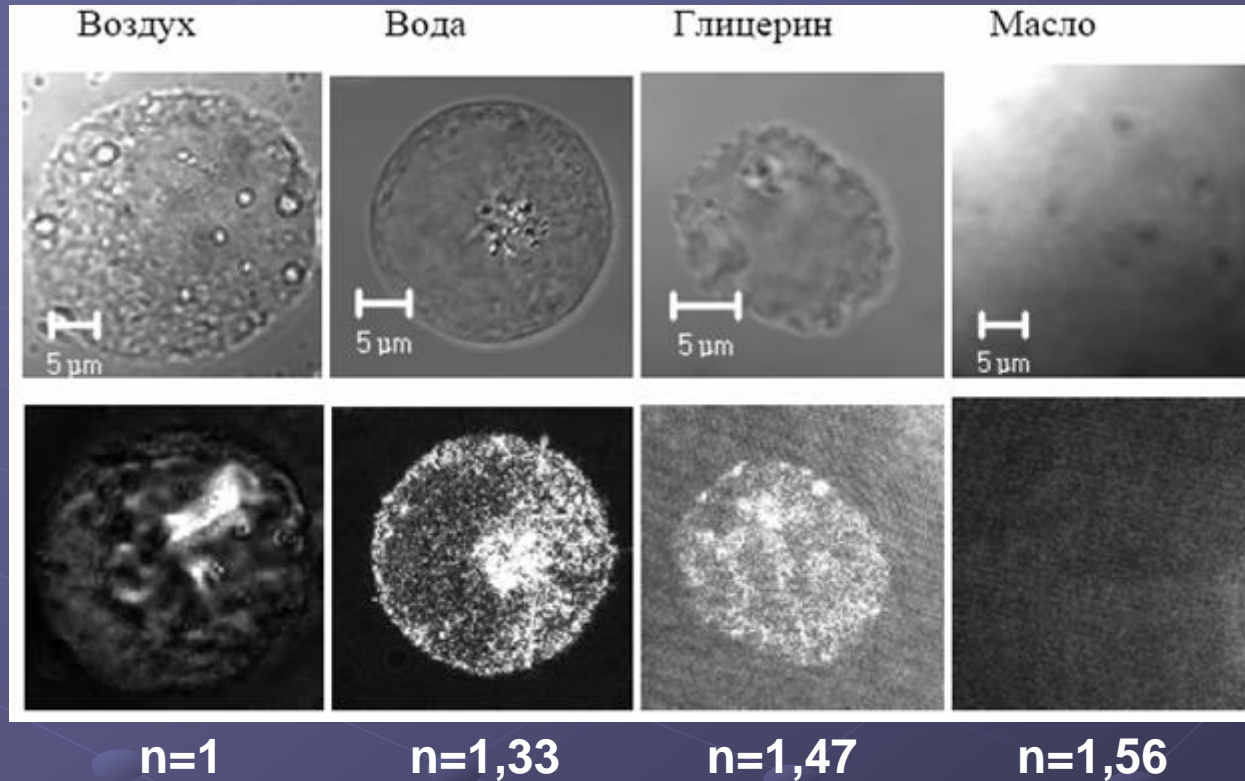
Sokolov et al. Cancer Res. 2003



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

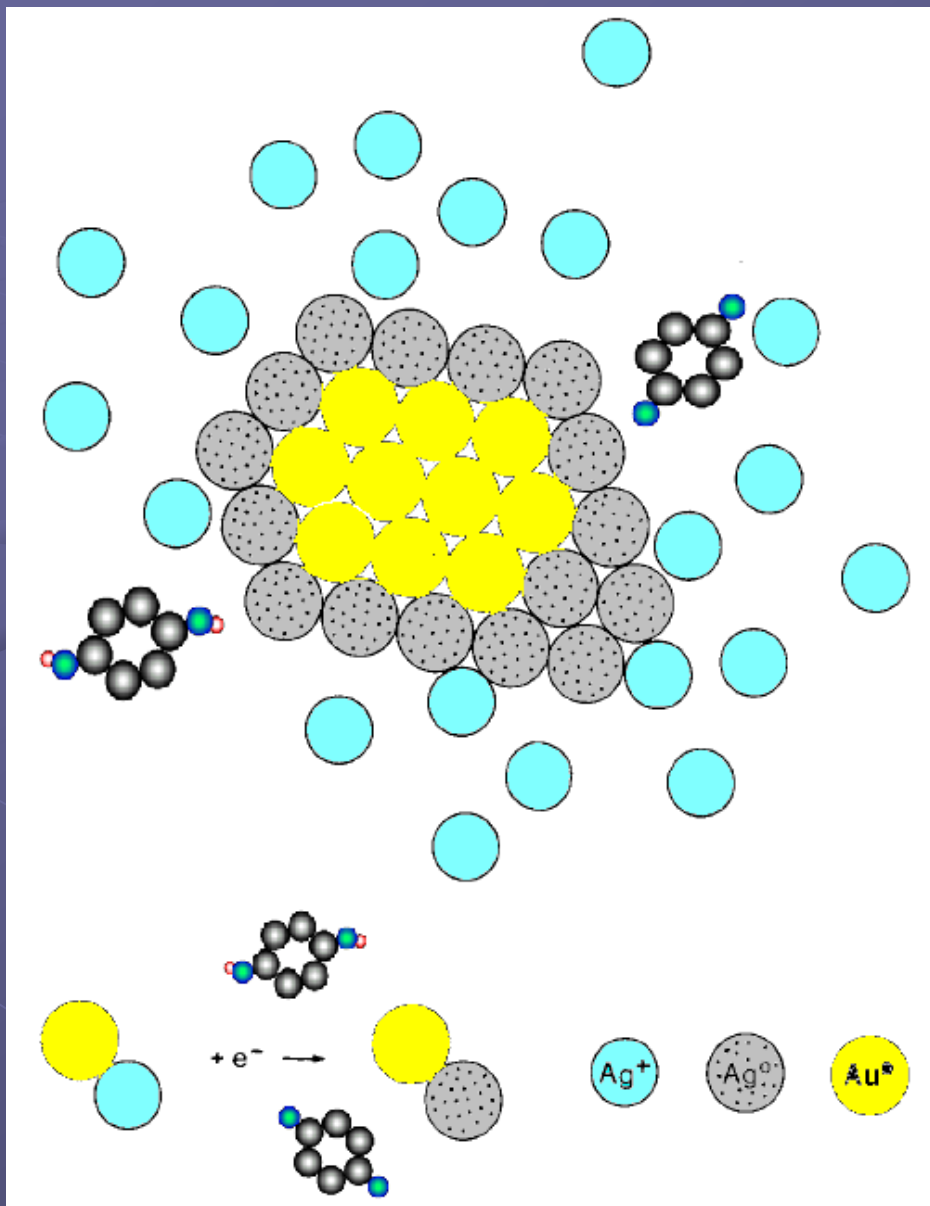


### Фиксаторы

Рекомендуются - параформальдегид, метанол.

Не рекомендуются - формалин, глутаровый альдегид

# Автометаллография



- благородные металлы (Ag, Au)
- тяжелые металлы (Cu, Zn, Fe, Cd)
- оксиды тяжелых металлов (ZnO, CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 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

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

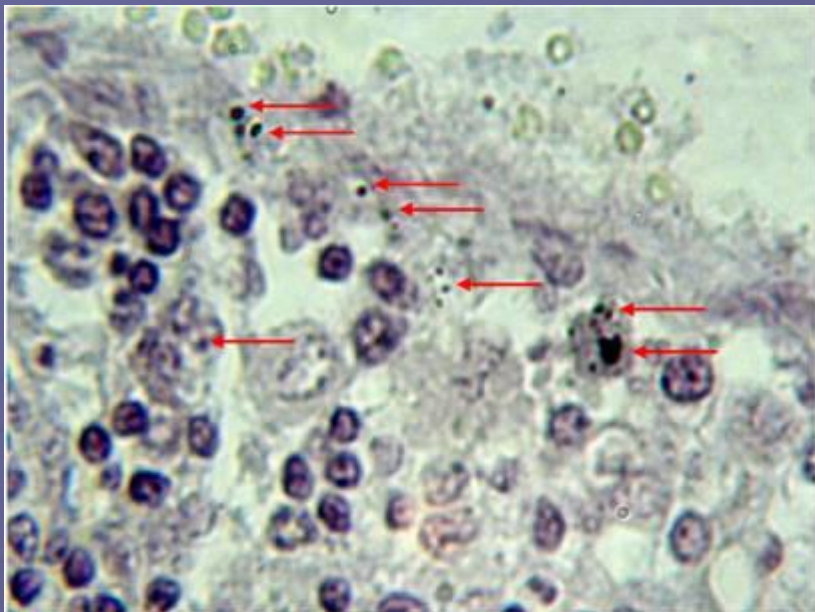
Срез инкубируется в «проявителе» в полной темноте (1 ч, 26 °С)

Промывка среза водой

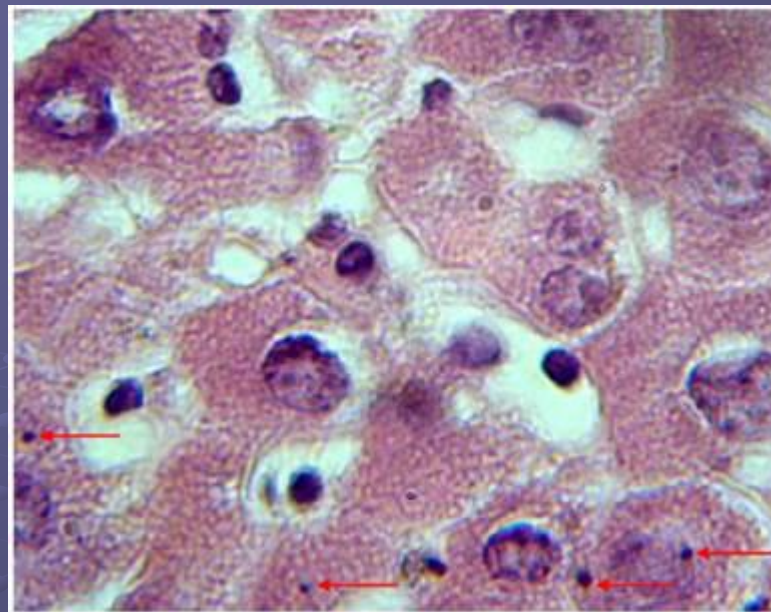
«Фиксация» в 5% тиосульфате натрия 10 мин

Промывка проточной водой 20 минут.

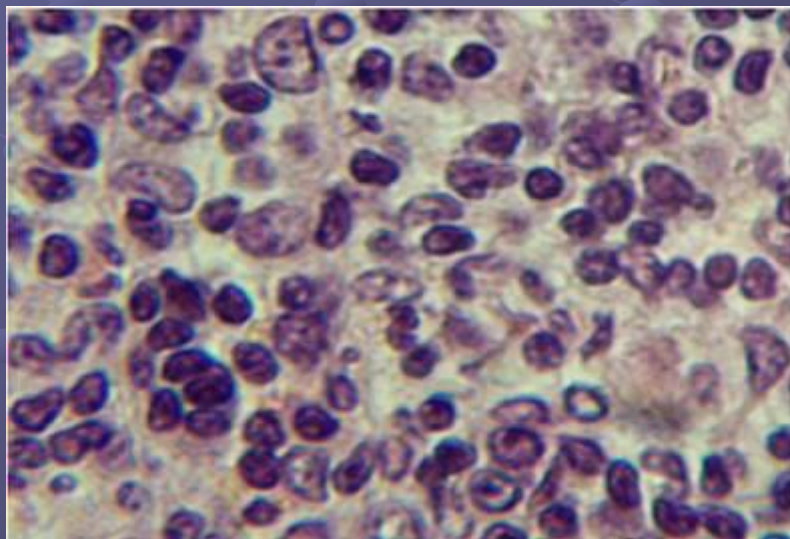
Гистохимическое окрашивание гематоксилином и эозином



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

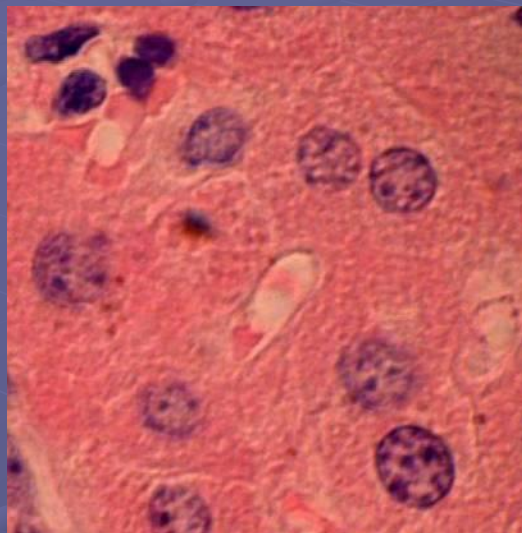


**наночастицы золота (35 нм) в срезе печени мышцы после аутометаллографирования и гистохимического окрашивания**

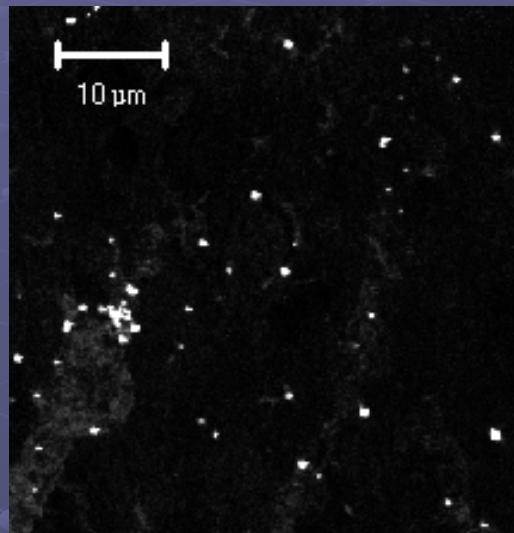


**контрольный срез лимфатического узла после аутометаллографирования и гистохимического окрашивания**

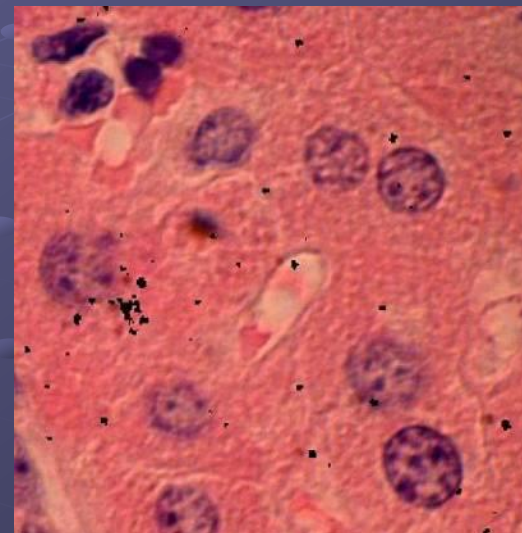
Комбинирование методов проходящего белого света и  
ЛСКМ в режиме регистрации светорассеяния от  
наночастиц серебра.



Светлое поле



ЛСКМ в режиме рассеяния



Наложение

Срезы после процедуры аутометаллографии и окрашивания  
гематоксилин-эозином



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

Предварительно требуется сульфидирование или селенидирование поверхности наночастиц

## Сульфидирование поверхности наночастиц

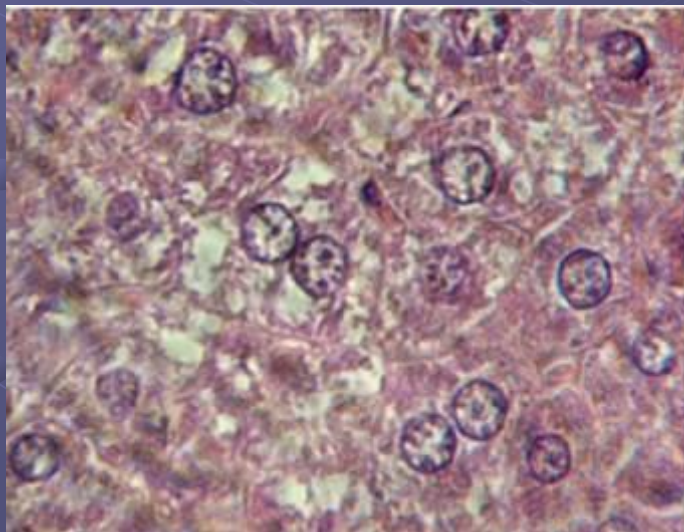
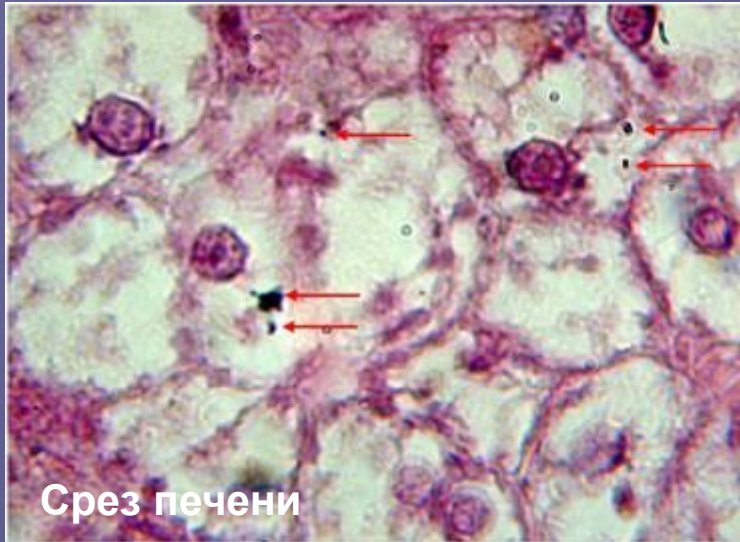
Срезы инкубируют (3 дня, 4 °С) с сульфидирующим раствором (0,1 М буферный раствор Зоренсена рН 7,4, 0,1 % сульфида натрия, 3 % глутарового альдегида).

Отмывка фосфатным солевым буфером

Автометаллографирование серебром

Гистохимическое окрашивание

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

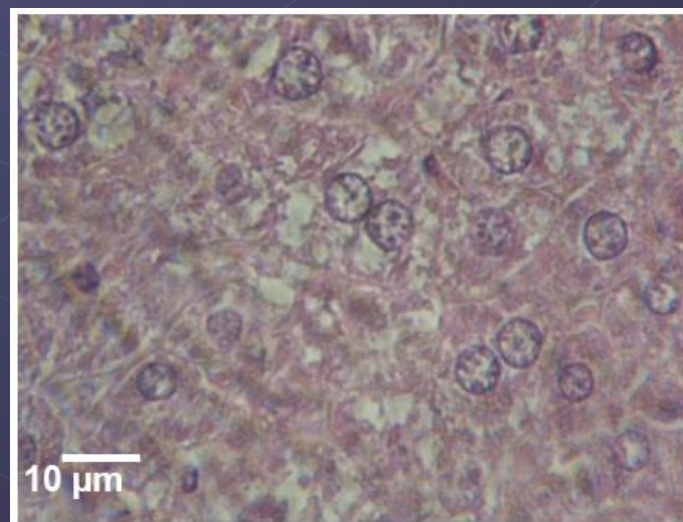
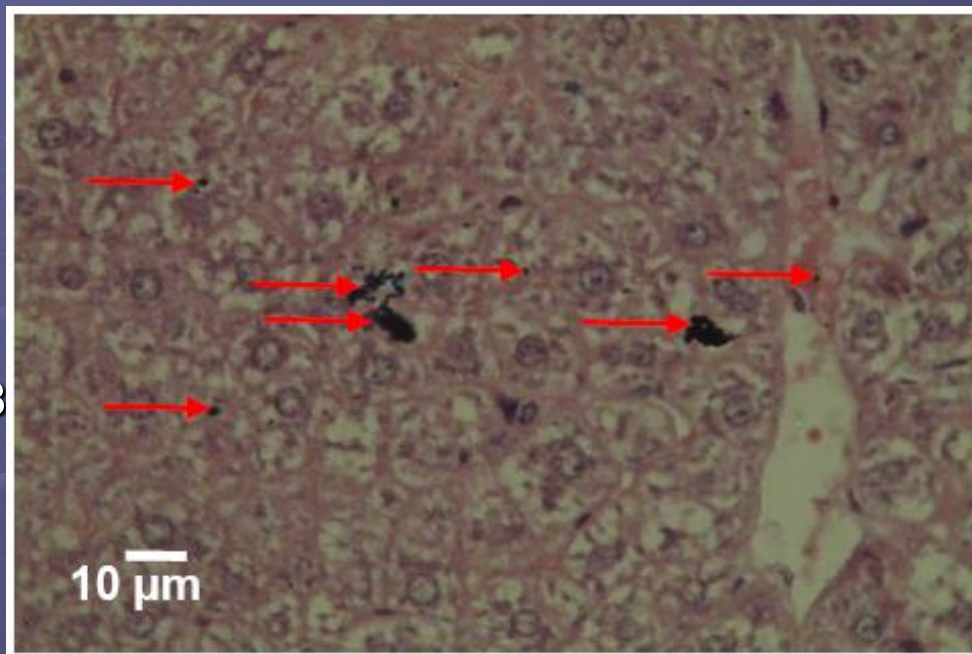


**Контрольный срез печени без инъекции наночастиц после сульфидирования, аутометаллографирования и гистохимического окрашивания**

# Источники артефактов, возникающих при автометаллографической детекции наночастиц

## пробоподготовка

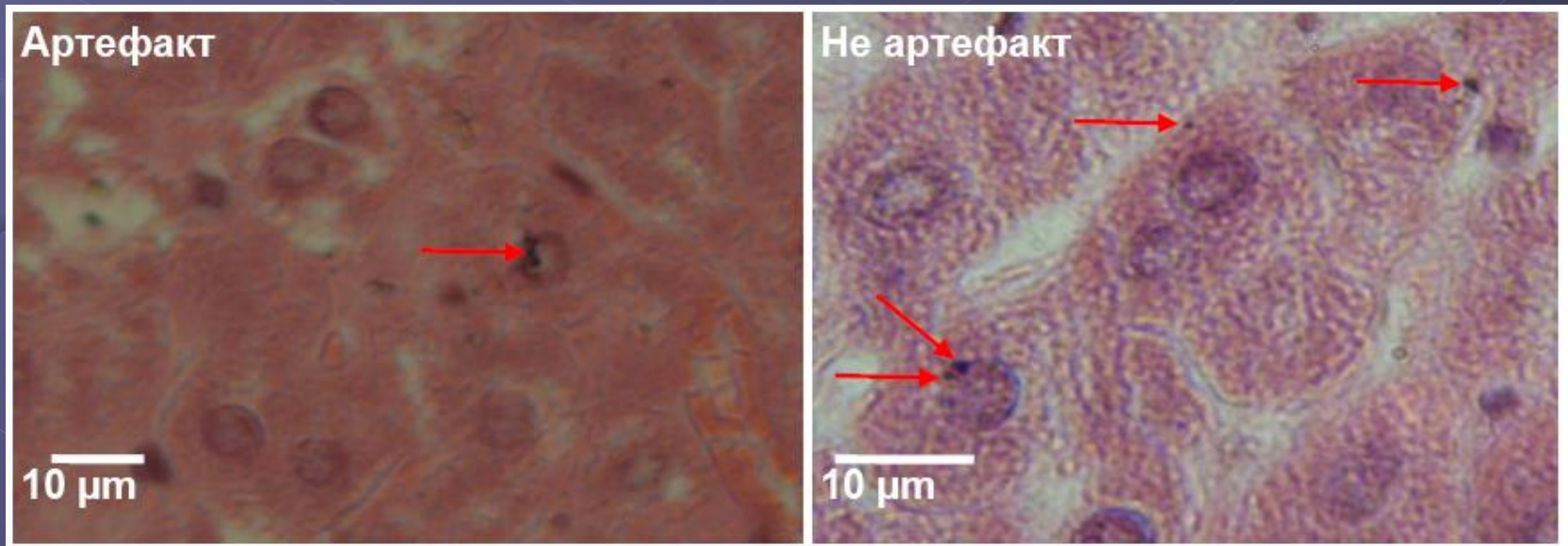
- неспецифическое осаждение серебра из раствора
- увеличение времени экспозиции;
- воздействие света на раствор;
- низкое качество реагентов



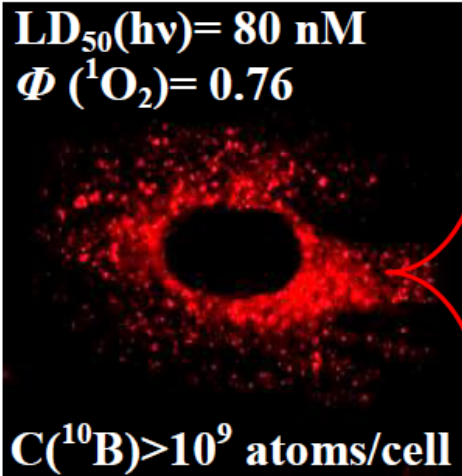
# Источники артефактов, возникающих при автометаллографической детекции наночастиц

## 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  $^1O_2$

