



## КОЛЛОИДНОЕ ЗОЛОТО В СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

*В.А. Богатырев*

Статья подготовлена по материалам лекции, прочитанной для школьников старших классов на школе-конференции «Нелинейные дни в Саратове для молодых – 2011». В лекции рассказывается о результатах экспериментальной работы студентов и аспирантов базовой кафедры биофизики ФНП СГУ и лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН, касающихся применения золотых плазмонно-резонансных частиц в цитологических исследованиях<sup>1</sup>. Рассматриваются некоторые оптические свойства золотых наночастиц, обеспечивающие их использование для выявления и лечения злокачественных образований (раковых клеток).

*Ключевые слова:* Коллоидное золото, наночастицы, плазмонный резонанс, светорассеяние, флуоресценция.

Строго научное название этой темы – использование плазмонно-резонансных частиц<sup>2</sup> для диагностики и лечения раковых заболеваний [1]. Сегодня мы будем говорить только об оптических свойствах золотых наночастиц, которые позволяют различать их (визуализировать) на уровне световой микроскопии, на фоне отдельных клеток.

Коллоидное золото это взвесь мельчайших частиц – наночастиц золота в жидкости, чаще всего в воде. Растворы твердых частиц в жидкостях называют *золями*. Частицы, размеры которых составляют десятки нанометров, участвуют в броуновском движении и подчиняются законам диффузии, вследствие чего не оседают. Частицы столь малых размеров не могут быть различимы в обычный световой микроскоп из-за так называемого дифракционного предела разрешения. Однако, если объект освещать таким образом, чтобы в объектив не попадали прямые лучи от источника света, то рассеивающие свет частицы будут видны как яркие точки на темном фоне. Такая микроскопия называется *темнопольной*. Ближайшая аналогия темнопольной микроскопии – вид планет в телескопе на ночном небе.

<sup>1</sup>Цитология – раздел биологии, изучающий живые клетки, их строение, функционирование, процессы клеточного размножения, старения и смерти.

<sup>2</sup>Плазмонный резонанс – оптическое свойство, характерное для металлических частиц с размерами меньше примерно 100 нм ( $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$ ).

Основным из оптических свойств плазмонно-резонансных частиц (ПРЧ), применимых к оптической микроскопии, является необычайно высокая светимость, обусловленная резонансным светорассеянием. Для сферической формы интенсивность рассеяния от одной частицы возрастает пропорционально, примерно, шестой степени ее линейного размера. Яркость свечения ПРЧ определяется интенсивностью светорассеяния, а цвет зависит от спектрального положения плазмонного резонанса. В зависимости от размера и формы наночастицы золота могут преимущественно (резонансно) рассеивать свет в диапазоне от зеленой (длина волны света  $\lambda \approx 550$  нм) до ближней инфракрасной области ( $\lambda \approx 1500$  нм). Интенсивность светорассеяния заметно возрастает и смещается в длинноволновую область при изменении сферической формы частиц на вытянутую. Такие частицы называют наностержнями (НСт). Наиболее интенсивно эти частицы рассеивают в области так называемого продольного или второго резонанса, соответствующего продольной поляризации частицы. Их часто обозначают с индексом длины волны спектрального положения этого максимума [2].

На рис. 1 приведен фрагмент фильма в покадровой развертке, показывающий поглощение золотых наностержней НСт 640 клетками иммунной системы – *макрофагами*<sup>3</sup>. Отдельные НСт 640 выглядели как темно красные точки на фоне сероголубого светорассеяния от клеточных структур. Светимость отдельных НСт весьма незначительна, и в образцах сразу после внесения золотые метки были практически не видны. Со временем увеличивалось количество клеток, имеющих яркие золотистые метки (светлое пятно в нижней части клетки), представляющие, по всей видимости, агрегаты НСт. Метки не теряли связи с активно перемещающимися клетками, в отличие от различных после 30 мин инкубации отдельных частиц и агрегатов, совершающих броуновские движения в инкубационной среде.

Анализ отснятого материала показал, что надежно визуализируются как отдельные свободные наночастицы, так и связанные с неподвижными и активно передвигающимися клетками. Однако примененная тогда нами техника не могла дать ответа – находятся ли наночастицы внутри клетки или на ее поверхности?

Кроме естественного любопытства, вопрос о локализации золотых наночастиц внутри или снаружи белых клеток крови имеет практическое значение в понимании механизма формирования иммунного ответа, выработке антител.

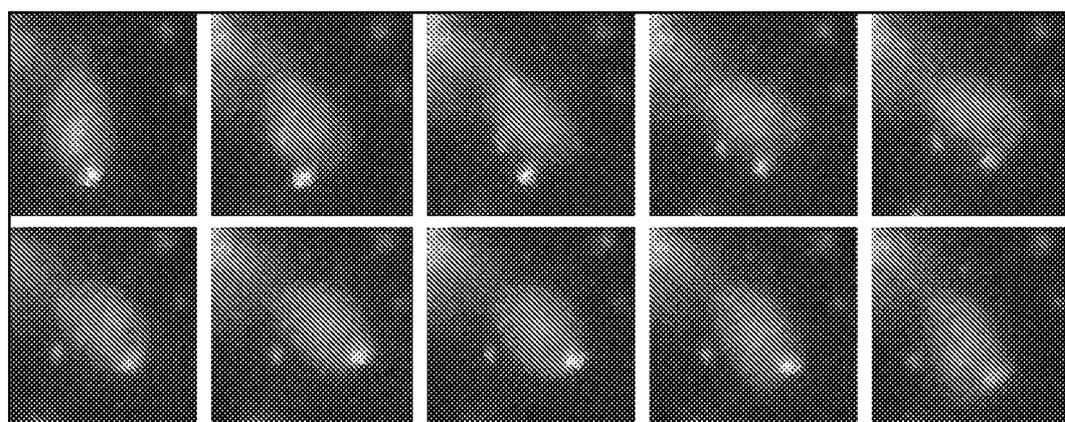


Рис. 1. Серия последовательных темнопольных изображений макрофагов с НСт 640

<sup>3</sup>Макрофаг – клетка, обладающая способностью к фагоцитозу (поглощению твердых частиц).

В настоящее время факт поглощения ПРЧ макрофагами и некоторыми раковыми клетками надежно установлен во многих научных лабораториях. Актуальными остаются вопросы выяснения путей проникновения наночастиц внутрь клетки.

В этом отношении хочется отметить работу испанских и американских ученых, совсем недавно опубликованную в журнале «Nanomedicine» [3]. В этой работе показано, что поглощение золотых сферических наночастиц с диаметрами менее 100 нм происходит как путем *фагоцитоза*, так и *макропиноцитоза*<sup>4</sup> при участии клеточных рецепторов-мусорщиков (*scavenger receptors*).

К сожалению, авторы в статье не приводят микроскопические изображения клеток, однако, можно предположить, что анализ этих изображений был очень непростой задачей. Не случайно в разделе «Материалы и методы» авторы отмечают, что анализ проводили два независимых специально обученных эксперта при использовании стандартных программ обработки цифровых изображений типа «ImageJ» [4]. Дело в том, что препараты исследовали в проходящем свете. Такой способ *микроденситометрических*<sup>5</sup> исследований вполне приемлем лишь при достаточно больших дозах поглощенных наночастиц.

Гораздо более четкие различия можно получить, используя микроскопию темного поля. На рис. 2, *а* приведена полученная нами микрофотография раковых клеток человека линии HeLa с частицами коллоидного золота 40 нм в диаметре (КЗ-40) в проходящем свете без какого-либо способа физического контрастирования. Для сравнения на рис. 2, *б* то же поле зрения снято в режиме темного поля.

Более четкий ответ о внутриклеточной локализации ПРЧ дает конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Основной принцип КЛСМ заключается в том, что на фотоприемник попадает только свет, проходящий через специальную диафрагму – пинхол, создавая, таким образом изображение плоскости сканирования, так называемый оптический срез, или *z*-стек.

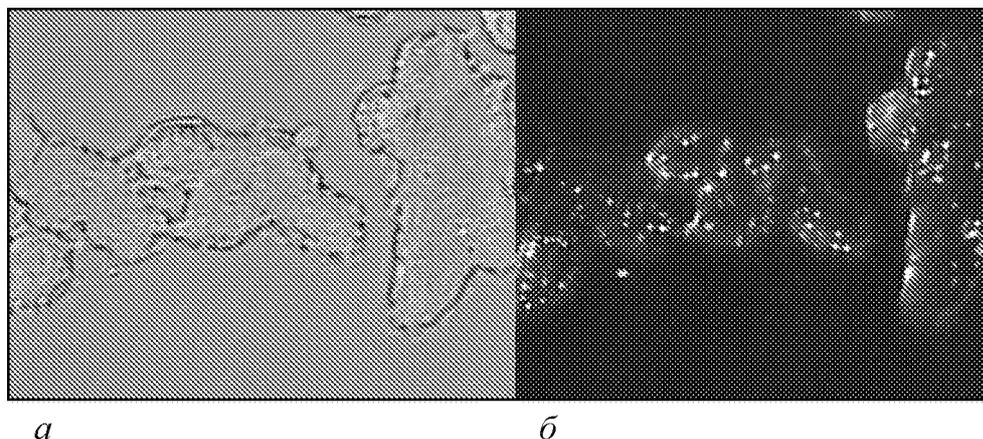


Рис. 2. Клетки HeLa с КЗ-40. Светлое поле проходящий свет (*а*), темное поле боковое освещение (*б*). Микроскоп Leica LMD 7000

<sup>4</sup>Пиноцитоз – активное поглощение клеткой жидкости из окружающей среды с формированием в цитоплазме пузырьков, содержащих жидкость. Макропиноцитоз – разновидность пиноцитоза, когда в состав пузырьков включены твердые частицы.

<sup>5</sup>Денситометрия – измерение плотности, в данном случае – оптической плотности.

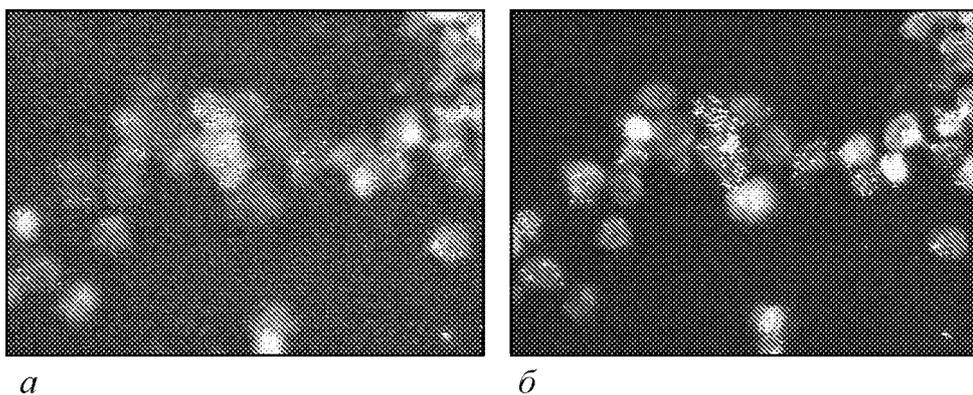


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa с КЗ-50 при комбинированном освещении, голубой канал (а), красный канал (б). Микроскоп Leica LMD 7000. Разложение по каналам цветов – программа ImageJ

Используя КЛСМ и золотые наночастицы, связанные с белком и *флуоресцентным*<sup>6</sup> зондом, мы показали, что ПРЧ способны проникать внутрь животной клетки. Дальнейшие наши усилия были направлены на выявление зависимости между накоплением ПРЧ клетками различных линий и их морфофизиологическими характеристиками: жизнеспособностью, дыхательной активностью. Одним из таких тестов является измерение нарушений барьерной функции наружных клеточных мембран. Для этой цели используют красители, которые могут проникнуть в клетку только при нарушении целостности клеточных оболочек. Например, флуоресцентный краситель пропидий йодистый (PI), проникая в клетку через поврежденную мембрану, связывается с ДНК, интенсивность флуоресценции (красное свечение) при этом резко усиливается.

На рис. 3 приведена микрофотография образца клеток HeLa с золотыми наночастицами 50 нм (КЗ-50) дополнительно окрашенных PI.

На экране монитора и в окуляры микроскопа мертвые клетки выглядят как ярко красные в отличие от живых – серо-голубых. Разложение цветового изображения на составляющие дает более четкое представление, что у мертвых клеток ярко окрашиваются ядра (в центре рис. 3, б). Золотые метки также более отчетливо видны в красном канале, поскольку рассеивают свет в основном в желто-красной области спектра. Анализ показывает, что золотые метки накапливаются в основном живыми клетками (область выше центра на рис. 3).

Интересные результаты нами были получены при использовании флуоресцентного красителя акридинового оранжевого в качестве *витального красителя*<sup>7</sup>. Особенностью акредина оранжевого является то, что он взаимодействует не только с нуклеиновыми кислотами, но и, хотя в значительно меньшей степени, с белками цитоплазмы [5]. Поэтому мы решили использовать его как контрастирующий краситель для КЛСМ.

В результате первых же экспериментов выяснилось, что даже сравнительно мелкие золотые наночастицы в препаратах окрашенных акридиновым оранжевым

<sup>6</sup> Флуоресценция – вынужденное (холодное) свечение некоторых веществ, возбуждаемое светом более короткой длины волны.

<sup>7</sup> Витальные красители используются для прижизненной окраски клеток.

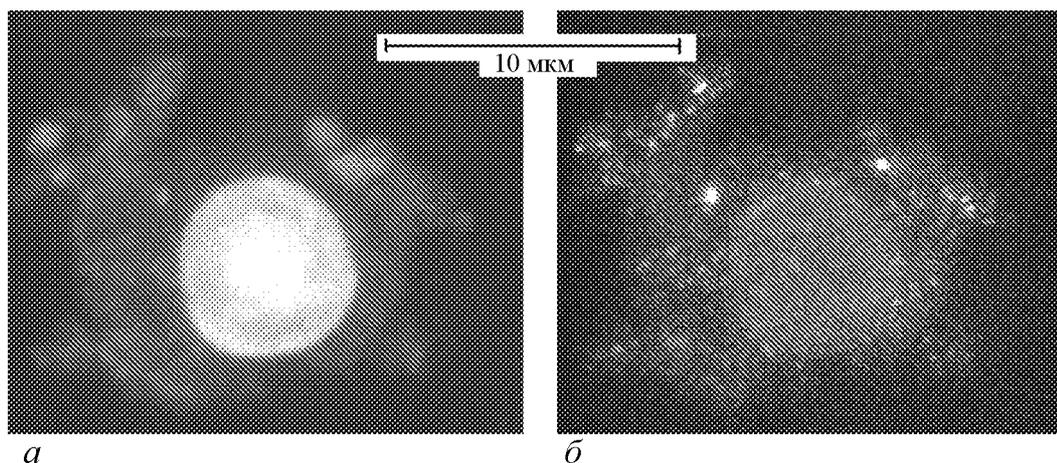


Рис. 4. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa с КЗ-50. Окраска акрединовым оранжевым. Зеленый канал (а); комбинированное освещение, красный канал (б). Микроскоп Leica LMD 7000. Разложение по каналам цветов – программа ImageJ

надежно выявляются в режиме регистрации светорассеяния (рис. 4). Вероятнее всего это связано с электростатическим взаимодействием катионного акрединового оранжевого с отрицательно заряженной поверхностью золотых наночастиц, в результате чего возрастает их светорассеяние. Анализ этих изображений показывает, что золотые наночастицы накапливаются только в цитоплазме, но не в ядре клетки.

### Заключение

Таким образом, золотые наночастицы являются удобным инструментом наблюдения за физиологическими клеточными процессами, хорошей альтернативой и дополнением к флуоресцентным зондам. Они надежно выявляются методами световой темнопольной и конфокальной лазерной микроскопии.

Параметры жизнеспособности могут быть оценены по нарушению барьерной функции мембран, изменению дыхательной активности, состоянию ядерного аппарата и др. с использованием стандартных цитохимических наборов.

Для системного использования плазмонно-резонансных частиц в микроскопии раковых клеток необходимо проведение планомерных контрольных и калибровочных экспериментов. Тем не менее, как говорят коллеги медики, *прогноз благоприятный!*

### Библиографический список

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение. М: Наука, 2008. 319 с.
2. Алексеева А.В., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н., Мельников А.Г., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Золотые наностержни: Синтез и оптические свойства // Коллоид. журн. 2006. Т. 68. С. 725.
3. Franca A., Aggarwal P., Barsov E.V., Kozlov S.V., Dobrovolskaia M.A., Gonzalez-Fernandez A. Macrophage scavenger receptor: A mediates the uptake of gold col-

- loids by macrophages in vitro // Nanomedicine (Lond). 2011. Vol. 6, № 7. P. 1175.
4. URL: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
5. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов / Учебно-методическое пособие. СПб: СОЛО, 2008. 72 с.

*Институт биохимии и физиологии  
растений и микроорганизмов РАН*

*Поступила в редакцию 31.12.2011*

## COLLOIDAL GOLD IN LIGHT MICROSCOPY

*V.A. Bogatyrev*

This article was prepared on the basis of a lecture for higher forms students on school-conference «Nonlinear days in Saratov for youth – 2011». The lecture discusses about the results of the experimental work on the use of gold plasmon-resonance particles in cytological studies of undergraduate and graduate students of the basic Chair of biophysics of DNP SSU and Laboratory of nanobiotechnology of IBPPM RAS. Some of the optical properties of gold nanoparticles are discussed to ensure their use for diagnostics and therapy of malignant tumors (cancer cells).

*Keywords:* Colloidal gold, nanoparticles, plasmon resonance, light scattering, fluorescence.



*Богатырев Владимир Александрович* – родился в Мончегорске Мурманской области (1958), окончил Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского (1980). После окончания СГУ работает в ИБФРМ РАН ведущим научным сотрудником. Защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук в РОСНИПЧИ «Микроб» (1995) по специальности микробиология и доктора биологических наук в ИБФРМ РАН (2005) по специальности биохимия. Работает в области биохимии, биофизики, нанобиотехнологии. Автор монографий «Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение» (в соавторстве с Дыкманом Л.А., Щеголевым С.Ю. и Хлебцовым Н.Г.), «Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant» (в соавторстве с Дыкманом Л.А., Староверовым С.А. и Щеголевым С.Ю.). Общее число публикаций 111 по направлениям, указанным выше.

410049 Саратов, пр-т Энтузиастов, д. 13

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

E-mail: bog@ibppm.sgu.ru